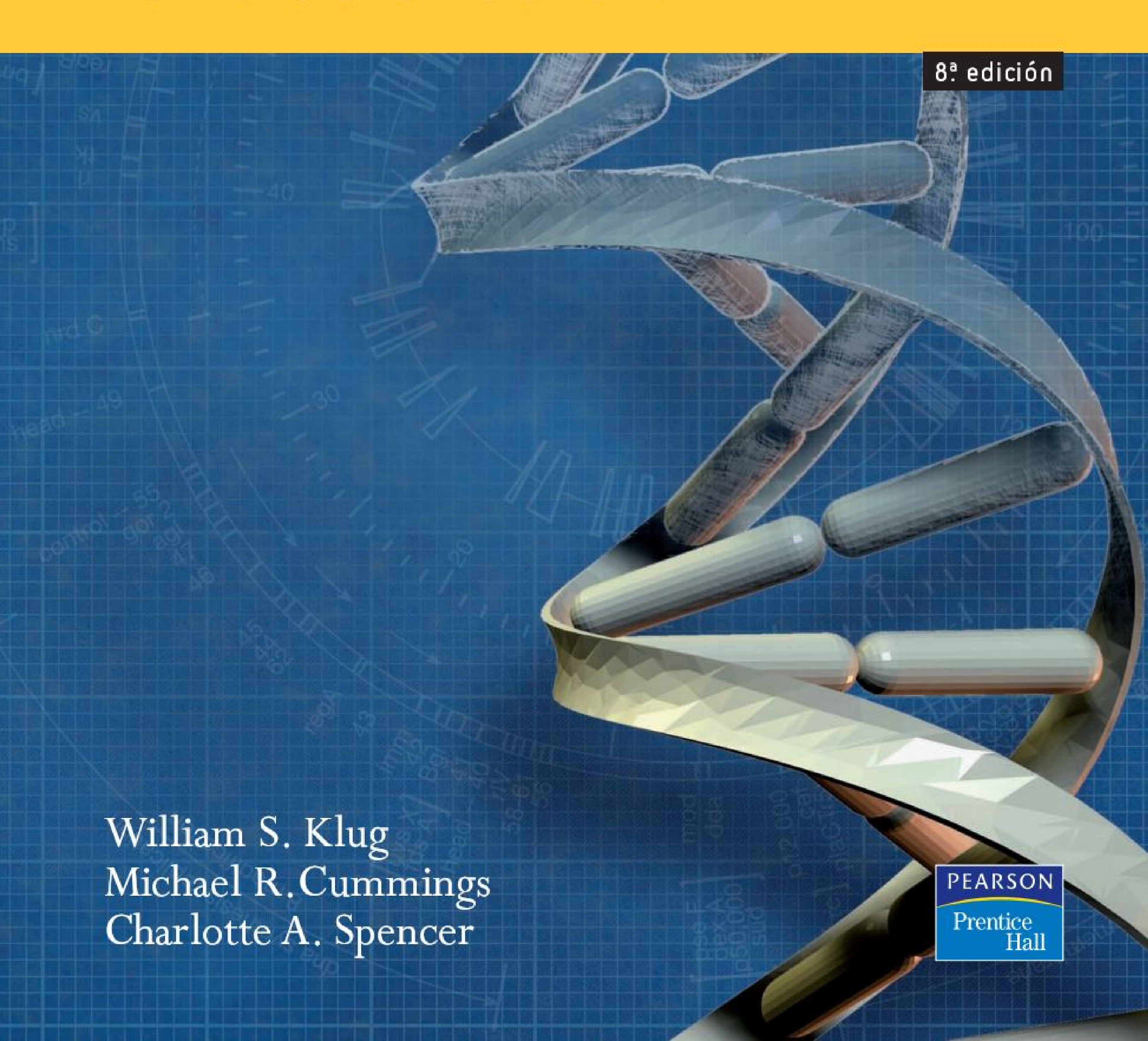
www.librosite.net/klug

Conceptos de Genética

8ª edición



William S. Klug
Michael R. Cummings
Charlotte A. Spencer

PEARSON
Prentice Hall

PREMIOS NOBEL CONCEDIDOS POR INVESTIGACIONES EN GENÉTICA O EN ÁREAS AFINES

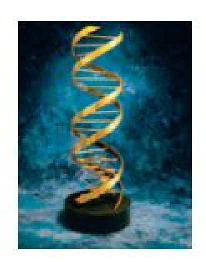
Año	Premiados	Premio Nobel en	Tema de investigación
2002	S. Brenner H. R. Horvitz J. E. Sulston	Medicina o Fisiología	Descubrimiento de la regulación genética del desarrollo de los órganos y de la muerte celular programada
2001	L. Hartwell P. Nurse T. Hunt	Medicina o Fisiología	Descubrimiento de los genes y de las moléculas reguladoras que controlan el ciclo celular
1999	G. Blobel	Medicina o Fisiología	Descubrimiento de que las proteínas tienen secuencias codificadas genéticamente que guían su transportes en las células
1997	S. Prusiner	Medicina o Fisiología	Descubrimiento de los priones —un nuevo principio biológico de infección
1995	E. B. Lewis C. Nusslein-Volhard E. Wieschaus	Medicina o Fisiología	Control genético del desarrollo temprano de *Drosophila*
1993	R. Roberts P. Sharp	Medicina o Fisiología	Procesado del RNA de genes fragmentados
	K. Mullis M. Smith	Química	Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la mutagénesis dirigida (SDM)
1989	J. M. Bishop H. E. Varmus	Medicina o Fisiología	Papel de los retrovirus y oncogenes en el cáncer
	T. R. Cech S. Altman	Química	Función de la ribozima en el corte y empalme del RNA
1987	S. Tonegawa	Medicina o Fisiología	Las bases genéticas de la diversidad de los anticuerpos
1985	M. S. Brown J. L. Goldstein	Medicina o Fisiología	Regulación genética del metabolismo del colesterol
1983	B. McClintock	Medicina o Fisiología	Elementos genéticos móviles en el maíz
1982	A. Klug	Química	Análisis de la estructura cristalina de complejos significativos, incluyendo al tRNA y a los nucleosomas
1980	P. Berg W. Gilbert F. Sanger	Química	Desarrollo de las tecnologías del DNA recombinante y de la secuenciación del DNA
1978	W. Arber D. Nathans H. O. Smith	Medicina o Fisiología	Tecnología del DNA recombinante utilizando endonucleasas de restricción
1976	D. C. Gajdusek	Medicina o Fisiología	Explicación de las enfermedades humanas basadas en priones, el kuru y la demencia de Creutzfeldt-Jakob
1975	D. Baltimore R. Dulbecco H. Temin	Medicina o Fisiología	Genética moléculas de los virus tumorales

Año	Premiados	Premio Nobel en	Tema de investigación
1972	G. M. Edelman R. R. Porter	Medicina o Fisiología	Estructura química de las inmunoglobulinas
	C. Anfinsen	Química	Relación entre la estructura primaria y terciaria de las proteínas
1970	N. Borlaug	Premio de la Paz	Mejora genética del trigo mejicano
1969	M. Delbruck A. D. Hershey S. E. Luria	Medicina o Fisiología	Mecanismos de replicación y estructura genética de los bacteriófagos
1968	H. G. Khorana M. W. Nirenberg	Medicina o Fisiología	Descifrado del código genético
	R. W. Holley	Medicina o Fisiología	Estructura y secuencia de nucleótidos del RNA de transferencia
1966	P. F. Rous	Medicina o Fisiología	Inducción vírica del cáncer en gallinas
1965	F. Hacob A. M. L'woff J. L. Monod	Medicina o Fisiología	Regulación genética de la síntesis enzimática en bacterias
1962	F. H. C. Crick J. D. Watson M. H. F. Wilkins	Medicina o Fisiología	Modelo de la doble hélice del DNA
	J. C. Kendrew M. F. Perutz	Química	Estructura tridimensional de las proteínas globulares
1959	A. Kornberg S. Ochoa	Medicina o Fisiología	Síntesis biológica del DNA y del RNA
1958	G. W. Beadle E. L. Tatum	Medicina o Fisiología	Control genético de los procesos bioquímicos
	J. Lederberg	Medicina o Fisiología	Recombinación genética en bacterias
	F. Sanger	Química	Estructura primaria de las proteínas
1954	L. Pauling	Química	Estructura de la hélice alfa de las proteínas
1946	H. J. Muller	Medicina o Fisiología	Inducción de mutaciones en *Drosophila* con rayos X
1933	T. H. Morgan	Medicina o Fisiología	Teoría cromosómica de la genética
1930	K. Landsteiner	Medicina o Fisiología	Descubrimiento de los grupos sanguíneos humanos

Conceptos de Genética



ESCULTURA EN BRONCE DEL MODELO DE LA DOBLE HÉLICE DEL DNA DE WATSON-CRICK.



Conceptos de Genética

Octava edición

WILLIAM S. KLUG

The College of New Jersey

MICHAEL R. CUMMINGS

Illinois Institute of Technology

CHARLOTTE A. SPENCER

University of Alberta

Traducción y Revisión Técnica

JOSÉ LUIS MÉNSUA

Catedrático de Genética

Universitat de València

DR. DAVID BUENO I TORRENS

Profesor Titular de Genética

Departament de Genètica, Universitat de Barcelona



Madrid • México • Santafé de Bogotá • Buenos Aires • Caracas • Lima • Montevideo
San Juan • San José • Santiago • São Paulo • White Plains

Datos de catalogación bibliográfica

CONCEPTOS DE GENÉTICA
W. S. Klug, M. R. Cummings y C. A. Spencer

PEARSON EDUCACIÓN, S.A., Madrid, 2006

ISBN 10: 84-205-5014-0
ISBN 13: 978-84-832-2691-9
Materia: Genética, 575

Formato: 215 × 270 Páginas: 920

CONCEPTOS DE GENÉTICA
William S. Klug, Michael R. Cummings y Charlotte A. Spencer

ISBN 10: 84-205-5014-0
ISBN 13: 978-84-205-5014-5
Depósito Legal:

PRENTICE HALL es un sello editorial autorizado de PEARSON EDUCACIÓN, S.A.

Edición en español:

Equipo editorial:
Editor: Miguel Martín-Romo
Técnico editorial: Marta Caicoya

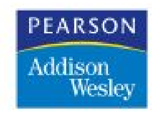
Equipo de producción:
Director: José A. Clares
Técnico: José A. Hernán

Diseño de cubierta: Equipo de diseño de Pearson Educación, S.A.

Composición: COPIBOOK, S.L.

Impreso por:

IMPRESO EN ESPAÑA - PRINTED IN SPAIN



Este libro ha sido impreso con papel y tintas ecológicos

Dedicatoria

PARA AQUELLOS QUE SIGNIFICAN LO MÁXIMO,

Los capitanes y reyes pueden gobernar el mundo, pero es la presencia de aquellos que amamos y la memoria de los que hemos perdido, pero que continúan viviendo en nuestros corazones, lo que da alegría de vivir y hace que todo lo que hagamos valga la pena.

Acerca de los autores

William S. Klug es profesor de Biología en The College of New Jersey en Ewing, New Jersey (anteriormente Trenton State College). Fue director del Departamento de Biología durante 17 años, puesto para el que fue elegido en 1974. Obtuvo su licenciatura en Biología (Bachelor of Arts) en el Wabash College de Crawfordsville, Indiana y su doctorado (Philosophy Degree) en la Northwestern University de Evanston, Illinois. Antes de llegar al The College of New Jersey, estuvo en el Wabash College como Profesor Adjunto. Su interés investigador se ha centrado en estudios ultraestructurales y de genética molecular sobre la oogénesis en *Drosophila*. Ha impartido cursos de Genética, y ha dirigido seminarios en genética humana y molecular para estudiantes postgraduados en Biología durante los últimos 35 años. En 2002 recibió el premio que otorgó The College of New Jersey al miembro de la Facultad cuyos mas exigentes alumnos alcanzaron las mejores notas. También recibió el 2004 Outstanding Professor Award de la Sigma Pi Internacional, y en el mismo año fue nominado como el Educador del Año, un premio dado por el Research and Development Council de New Jersey.

Michael R. Cummings es actualmente profesor de investigación del Departamento de Ciencias Biológicas, Químicas y Físicas del Illinois Institute of Technology, Chicago, Illinois. Durante más de 25 años ha sido miembro del Departamento de Ciencias Biológicas y del Departamento de Genética Molecular de la University of Illinois, en Chicago. También ha estado en las facultades de la Northwestern University y Florida State University. Se licenció en el St. Mary's College de Winona, Minnesota y obtuvo su master y doctorado en la Northwestern University de Evanston, Illinois. Además de este texto y de los volúmenes que lo acompañan, ha escrito también libros de texto en genética humana y en biología general para jóvenes. Su interés investigador se ha centrado en la organización molecular y en el mapa físico de regiones heterocromáticas de cromosomas acrocéntricos humanos. Ha impartido cursos de genética mendeliana y molecular, en genética humana y en biología general para postgraduados, y ha recibido numerosos premios por su calidad de enseñante concedidos por facultades universitarias, organizaciones de estudiantes y graduados.

Charlotte A. Spencer es actualmente Profesora Asociada del Departamento de Oncología de la University of Alberta de Edmonton, Alberta, Canada. Ha sido también miembro del Departamento de Bioquímica de la University of Alberta. Obtuvo su licenciatura en Microbiología en la University of British Columbia y su doctorado en Genética en la University of Alberta, seguido de un curso postdoctoral en la Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle, Washington. Su interés investigador esta relacionado con la regulación de la transcripción de la polimerasa II del RNA en células cancerosas, en células infectadas con DNA vírico y en células que están pasando por la fase mitótica del ciclo celular. Ha dictado cursos de Bioquímica, Genética, Biología molecular y Oncología, tanto a nivel pregraduado como postgraduado. Ha contribuido con los ensayos sobre Genética, Tecnología y Sociedad en varias ediciones de *Conceptos de Genética* y *Essentials of Genetics*. Además, ha escrito folletos para la serie de Prentice-Hall Exploring Biology, dirigida a pregraduados de niveles no superiores.

Contenido abreviado

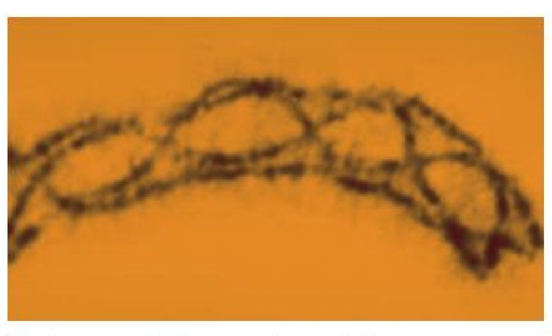
Contenido





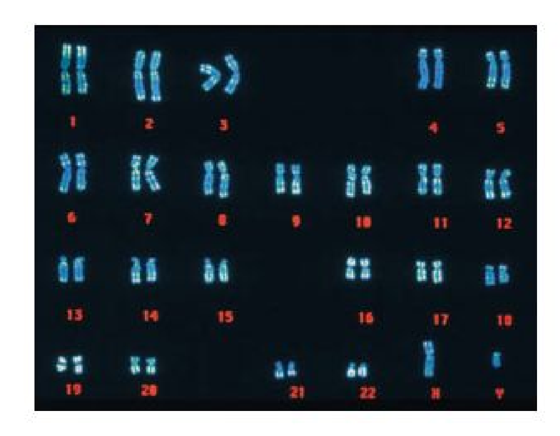






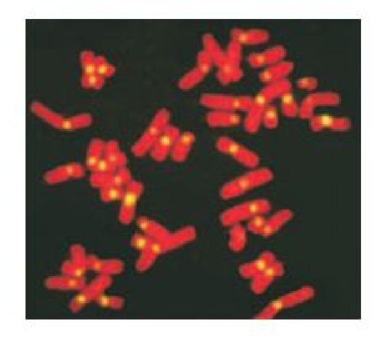


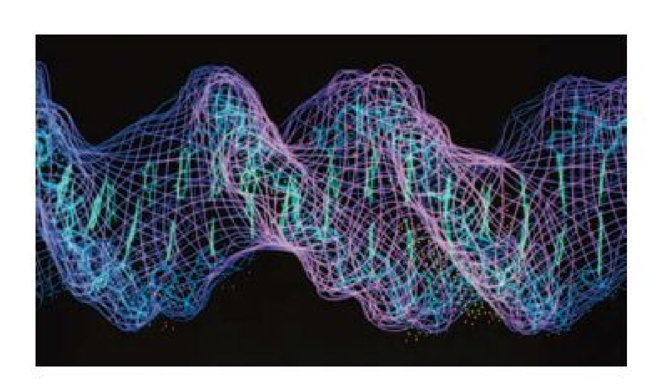


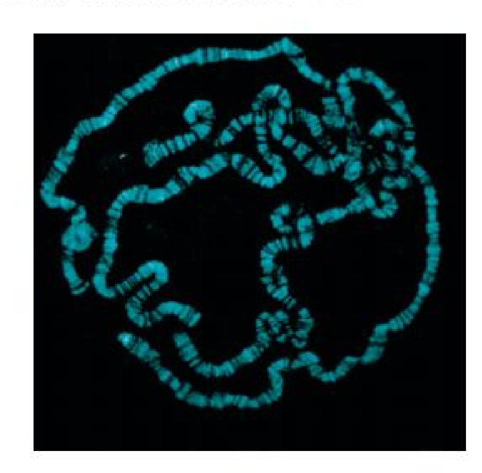




Segunda parte
DNA: estructura, replicación y variación







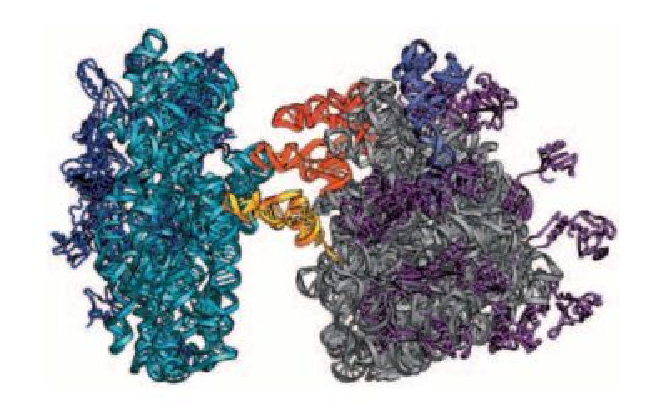




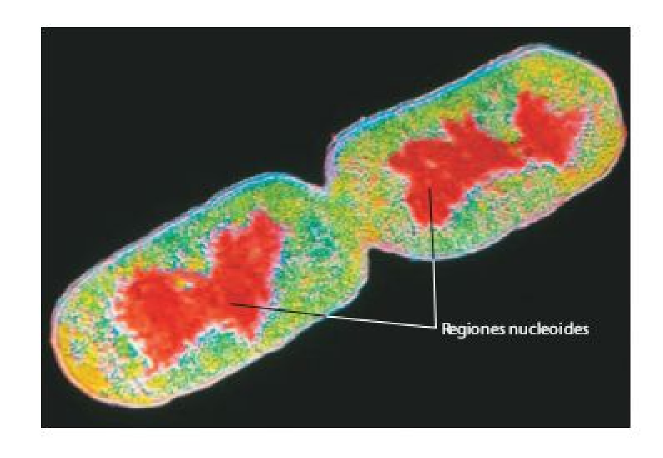
Tercera parte
Expresión y regulación de la información genética

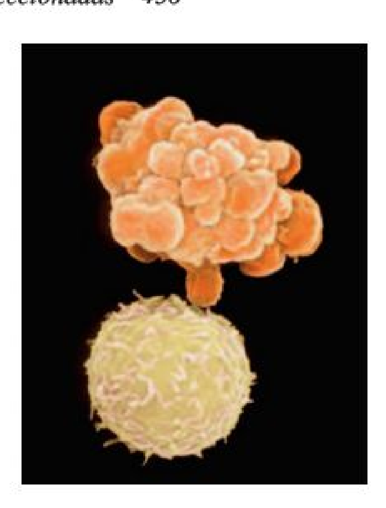
13 El código genético y la transcripción 351

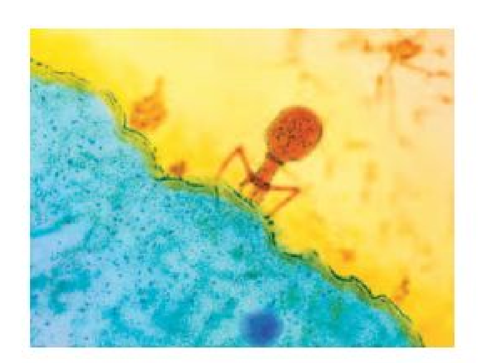
14 Traducción y proteínas 383



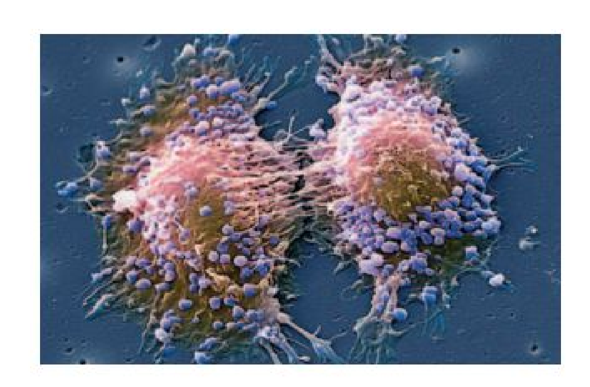



Regiones nucleoides

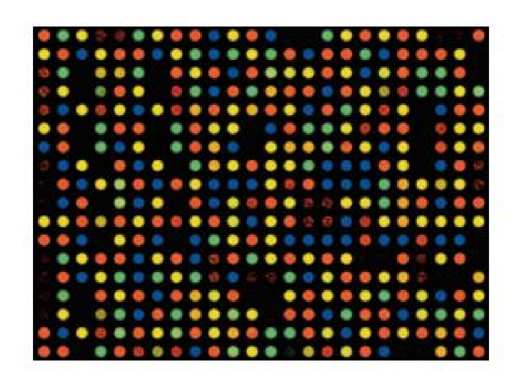








18 Regulación del ciclo celular y cáncer 501



Cuarta parte
Análisis genómico

19 Tecnología del DNA recombinante 529

20 Genómica y proteómica 563



21 Disección de la función génica: análisis mutacional en organismos modelo 603

22 Aplicaciones y ética de la biotecnología 643





Quinta parte
Genética de los organismos y poblaciones



Prefacio

A veces es útil para los autores de libros de texto volver la vista atrás y mirar su trabajo con nuevos ojos, de qué manera representa el cuerpo informativo de su área y cómo está estructurado el material, tanto científica como pedagógicamente. La publicación de la octava edición de *Conceptos de Genética*, actualmente en su tercera década proporcionando apoyo a los estudiantes, presenta la oportunidad para una nueva revisión. El campo de la genética ha crecido enormemente desde que se publicó el libro por primera vez, tanto en lo que sabemos como en lo que deseamos que aprendan los nuevos estudiantes. Al producir esta edición, buscamos no solo familiarizar a los estudiantes con los descubrimientos mas importantes de los pasados 150 años, sino también ayudarles a relacionar esta información con los mecanismos genéticos subyacentes que explican los procesos celulares, la diversidad biológica y la evolución. Además, también hemos puesto de relieve las conexiones entre la genética de la transmisión, la genética molecular, la genómica y la proteómica.

En los primeros años de este nuevo milenio, los descubrimientos en genética continúan siendo numerosos y profundos. Como estudiante de genética, la excitación de formar parte de esta era debe estar equilibrada por un fuerte sentido de la responsabilidad y una atención cuidadosa a muchos temas científicos, sociales y éticos que ya han aparecido y otros que indudablemente surgirán en el futuro. Los responsables políticos, los legisladores y un publico informado dependerán cada vez mas del conocimiento de los detalles de la genética a fin de encararse a estos temas. Por ello, nunca ha sido tan grande la necesidad de un texto de genética que explique claramente los principios de la genética.

Objetivos

En la 8.ª edición de *Conceptos de Genética*, como con todos los pasados esfuerzos, tenemos seis objetivos principales:

- Recalcar los conceptos básicos de la genética;
- Escribir clara y directamente para los estudiantes, a fin de proporcionar explicaciones comprensibles de temas analíticos complejos;
- Establecer una organización cuidadosa dentro y entre capítulos;
- Mantener un énfasis constante sobre la ciencia como una manera de ilustrar cómo sabemos lo que sabemos;
- Propagar la rica historia de la genética que tan bellamente aclara cómo se adquiere la información en la disciplina a medida que se desarrolla y crece;
- Crear figuras a todo color atractivas, agradables y pedagógicamente útiles, realzadas con fotografías igualmente provechosas para apoyar el desarrollo de conceptos.

El conjunto de estos objetivos sirve de piedra angular a los *Conceptos de Genética*. Estos fundamentos pedagógicos permiten que el libro sea utilizado en cursos con muchas propuestas y formatos de lectura distintos. Aunque el libro presenta una tabla coherente de contenidos que representa un enfoque para ofrecer un curso de genética, no obstante los capítulos se han escrito para ser independientes entre sí, permitiendo a los instructores utilizarlos en órdenes variados. Creemos que los enfoques variados incluidos en estos objetivos proporcionan juntos al estudiante un apoyo óptimo para su estudio de la genética.

Escribir un libro de texto que alcance estos objetivos y tener la oportunidad de mejorarlo continuamente en cada nueva edición, ha sido un agradable trabajo para nosotros. La creación de cada una de las ocho ediciones es un reflejo no sólo de nuestra pasión por enseñar genética, sino también la retroalimentación constructiva y el apoyo proporcionado por adaptadores, revisores y nuestros estudiantes durante las pasadas tres décadas.

Aspectos de esta edición

- Organización: una nueva organización refleja mejor como se enseña la genética en la era de la genómica. Un nuevo capítulo introductorio (Capítulo 1) da una visión de conjunto de la biología molecular como vía para conectar los primeros capítulos de la genética de la transmisión con los aspectos moleculares. Se intercala un mejor tratamiento de los organismos modelo a lo largo de los capítulos, pero es especialmente evidente en los nuevos capítulos sobre la disección de la función génica utilizando el análisis mutacional (Capítulo 21).
- Pedagogía: en cada capítulo aparecen varias veces dos nuevos elementos. El primero: «¿Cómo lo sabemos?», pide al estudiante que refleje una mas completa compresión de las bases experimentales de un importante descubrimiento, en

lugar de memorizar las conclusiones que se deducen del grueso de la investigación. El segundo elemento: «Ahora resuelva esto», orienta al estudiante hacia un problema que se encuentra al final del capítulo y que está relacionado con la discusión previa. En cada caso, se proporciona una sugerencia pedagógica. Cada elemento presenta un icono apropiado para su fácil identificación. Esperamos que el uso de estos elementos a lo largo de cada capítulo desafíe al estudiante a profundizar en la información que acaban de estudiar.

- Capítulos nuevos/revisados: para mantener nuestro intento de aumentar la información sobre organismos modelo utilizados en estudios genéticos y para ampliar sobre el uso de mutaciones en el estudio de la función génica, se ha escrito un nuevo capítulo titulado «Disección de la función génica: Análisis mutacional en organismos modelo» (Capítulo 21). Este capítulo reúne información previamente dispersa en muchos capítulos y se amplía considerablemente. La información reunida refleja los sofisticados planteamientos actuales utilizados para estudiar la función génica y proporciona ideas sobre el papel de los «organismos modelo» en el estudio genético. Además, hemos dedicado una atención particular a la información sobre la genética cuantitativa, genética de poblaciones y genética evolutiva (Capítulos 24, 25 y 26). La información de estos capítulos ha sido ampliamente revisada, y su revisión refleja las mejores ideas de muchos colegas con formación especializada en estos campos.
- Modernización de los temas: aunque hemos puesto al día cada capítulo para reflejar los descubrimientos mas actuales y significativos en genética, hemos dedicado una atención particular a los temas mas incisivos sobre genómica comparativa, bioinformática y proteómica (Capítulo 20) por su impacto en estudios futuros y en la sociedad. También son claramente evidentes las discusiones sobre las aplicaciones actuales de la biotecnología del DNA y los temas éticos que surgen (Capítulo 22). Además, hemos puesto al día y ampliado nuestra presentación de la genética del cáncer, campo que avanza rápidamente (Capítulo 18). Una mas profundas consideraciones sobre la genética de la conservación (Capítulo 27) quedan como otro sello de nuestra moderna información genética. Este campo, que intenta estimar y mantener la diversidad genética de especies en peligro de extinción, permanece en la frontera de los estudios genéticos.
- Ilustraciones nuevas: la 8.ª edición presenta una completa paleta de colores nuevos así como dibujos nuevos de casi todas las figuras para incrementar su valor pedagógico y cualidades artísticas. Muchas figuras presentan «diagramas de flujo» que guían visualmente al estudiante a través de protocolos y técnicas experimentales.
- Fotografías nuevas: un mayor número de fotografías ilustran y realzan esta edición.
- Número de las secciones: todas las secciones principales están numeradas, haciendo mas fácil asignar y localizar temas dentro de los capítulos.
- Ensayos nuevos/revisados sobre «Genética, tecnología y sociedad»: como con cada nueva edición, hemos revisado muchos de estos ensayos y se han añadido nuevos para reflejar los descubrimientos recientes en genética y su impacto en la sociedad. Entre los nuevos ensayos se encuentran los que tratan de la enfermedad de Tay-Sachs (Capítulo 3), lugares cromosómicos frágiles y cáncer (Capítulo 8), sentido de colectividad (Capítulo 16) y pérdida de la regulación génica y enfermedades humanas (Capítulo 17). Estas nuevas adiciones de ensayos suplementarios de las ediciones pasadas, incluyen los que discuten las vacunas comestibles, la selección del sexo en la especie humana, alimentos modificados genéticamente, terapia génica y especies en peligro de extinción, como la pantera de Florida, entre otros muchos temas.
- Énfasis en la resolución de problemas: en la sección «Problemas y preguntas a discusión» al final de los capítulos, se han añadido unos 200 problemas nuevos. Muchos son problemas del «extremo alto» que se encuentran en la subsección llamada «Problemas extra-picantes» que se encuentra al final de los capítulos. Muchos de estos se basan en datos derivados de publicaciones originales de genética. Las secciones «Ideas y soluciones» que se encuentran al final de los capítulos continúan guiando al estudiante en el aprendizaje del pensamiento analítico de los problemas.
- Medios para instructores y estudiantes preparados para las necesidades reales: se ha incrementado el apoyo en lecturas introductorias y otros aspectos de la enseñanza, como acceso electrónico a más textos, fotos y tablas y una mayor variedad de ofertas de «Power-Point» en el libro del Centro de Recursos para el Instructor y en CD/DVD. Los medios que se encuentran en el renovado «Companion Website» reflejan el creciente conocimiento que los estudiantes de hoy deben usar en su tiempo limitado de estudio tan juiciosamente como sea posible.

Énfasis en conceptos

Conceptos de Genética, como su título implica, enfatiza el armazón conceptual de la genética. Nuestra experiencia con este libro, reforzada por las muchas personas que lo siguen, con quienes hemos estado en contacto durante años, demuestra muy claramente que el objetivo primario de los estudiantes es la comprensión de conceptos lo mas fácilmente posible y adquirir en cursos sucesivos las ideas mas importantes de genética así como una visión analítica de la resolución de problemas biológicos.

Para ayudar a los estudiantes a identificar aspectos conceptuales de un tema importante, cada capítulo comienza con una nueva sección llamada «Conceptos del capítulo», que resalta las ideas mas importantes que se van a presentar. Dentro de cada capítulo, como se indicó anteriormente, el «¿Cómo lo sabemos?» pide al estudiante que conecte conceptos con experimentos. Luego, el «Ahora resuelva esto» pide al estudiante que conecte la comprensión conceptual de una manera mas in-

mediata para la resolución de problemas. Además, cada capítulo termina con «Resumen del capítulo» que enumera los cinco a diez puntos clave que se han cubierto. En conjunto, todo esto ayuda a asegurar que el estudiante se fije y comprenda conceptos a medida que se enfrenta a un extenso vocabulario y a los muchos e importantes detalles de la genética. Figuras diseñadas cuidadosamente también apoyan este planteamiento a lo largo del libro.

Solución de problemas e Ideas y soluciones

Para optimizar las oportunidades de que el estudiante crezca en las áreas importantes de la solución de problemas y pensamiento analítico, cada capítulo integra preguntas en «Ahora resuelva esto» con el acompañamiento de sugerencias pedagógicas y concluye con una extensa colección de «Problemas y preguntas a discusión». Están diseñados con varios niveles de dificultad, con los mas desafiantes (los que se llaman Problemas extra-picantes) situados al final de cada sección. En el Apéndice B hay respuestas breves a la mitad de los problemas. El *Libro del estudiante* contesta cada problema y está disponible para los estudiantes cuando la Facultad decida que es adecuado. Como verá el lector familiarizado con ediciones anteriores, hay unos 200 problemas nuevos que aparecen al final de los capítulos.

Como ayuda al estudiante para resolver problemas, la sección «Problemas y preguntas a discusión» de cada capítulo viene precedida por una sección, que ha tenido mucho éxito y se ha convertido en muy popular, llamada «Ideas y soluciones». En esta ampliada sección subrayamos:

La solución de problemas.
El análisis cuantitativo.
El razonamiento analítico.
El análisis experimental.

Se proponen problemas y preguntas y se proporcionan soluciones o respuestas detalladas. Esto prepara a los estudiantes a circular por la sección «Problemas y preguntas a discusión» con la que concluye cada capítulo.

La sección Genetic MediaLab está disponible en el Companion Website. Contiene varios problemas relacionados con la web diseñados para incrementar y ampliar los temas presentados en el capítulo. Para completar estos problemas, los estudiantes deben de participar activamente en los ejercicios y experimentos virtuales. Como referencia, el tiempo estimado necesario para resolver el problema se indica al principio de cada ejercicio.

Edición alternativa

Para ayudar a los instructores que quieren organizar su curso destacando la genética molecular antes que la genética de la transmisión, existe una versión alternativa de este libro titulada *Genética: Una perspectiva molecular*. Comienza con el DNA y establece las bases de la función génica a nivel molecular antes de volver a considerar los importantes descubrimientos históricos de la «genética de la transmisión».

Reconocimientos

Colaboradores

Comenzamos con un especial reconocimiento de aquellos que han hecho contribuciones directas a este texto. Agradecemos particularmente a Sarah Ward de la Colorado State University por confeccionar el Capítulo 27 sobre Genética de la Conservación y también por proporcionar borradores revisados de los capítulos en relación con la genética cuatitativa y de poblaciones. Además, Amanda Norvell revisó varias secciones destacando la genética molecular de eucariotas y Janet Morrison revisó numerosos aspectos de la genética evolutiva. Katherine Uyhazi escribió el ensayo sobre el sentido de colectividad en bacterias del Capítulo 16 y ayudó revisando otros ensayos. Los últimos tres son colegas del The College of New Jersey. Además, agradecemos a Mark Shotwell de la Slippery Rock University por su contribución con varios ensayos sobre «Genética, Tecnología y Sociedad». Como con las ediciones anteriores, Elliott Goldstein, de la Arizona State University, estuvo siempre fácilmente disponible para consultarle sobre los hallazgos mas actuales en genética molecular. También expresamos nuestras especiales gracias a Harry Nickla de la Creighton University. En su papel de autor del *Student Handbook* y del *Instructor's Manual*, ha revisado y editado los problemas del final de cada capítulo. También ha proporcionado las breves respuestas a los problemas seleccionados que aparecen en el Apéndice B.

Estamos agradecidos a todos los colaboradores anteriores, no sólo por compartir sus conocimientos en genética, sino por su dedicación a este proyecto así como por la agradable relación que proporcionaron.

Correctores de pruebas

Corregir las pruebas de un manuscrito de un texto de 853 páginas merece los mayores agradecimientos. Nuestro máximo aprecio para las cuatro personas que afrontaron dicha tarea con paciencia, diligencia y buen humor:

Tamara Horton Mans, Princeton University
Arlene Larson, University of Colorado, Denver
Virginia McDonough, Hope College
Janice Rumph, Montana State University

Revisores

El conjunto del texto depende de las importantes mejoras proporcionadas por muchos revisores. Mientras que aceptamos toda la responsabilidad por cualquier error en el libro, reconocemos agradecidamente la ayuda proporcionada por aquellas personas que revisaron el contenido y la pedagogía de ésta y de la edición anterior:

Laurel F. Appel, Wesleyan University
Ruth Ballard, California State University, Sacramento
George Bates, Florida State University
Sidney L. Beck, DePaul University
Peta Bonham-Smith, University of Saskatchewan
Paul J. Bottino, University of Maryland
Philip Busey, University of Florida
Alan H. Christensen, George Mason University
Jim Clark, University of Kentucky
Diane Dalo, The College of New Jersey
Garry Davis, University of Alaska, Anchorage
Johnny El-Rady, University of South Florida
Bert Ely, University of South Carolina
Lloyd M. Epstein, Florida State University
Dale Fast, Saint Xavier University
Donald Gailey, California State University, Hayward
George W. Gilchrist, Clarkson University
Sandra Gilchrist, University of South Florida
Thomas J. Glover, Hobart & William Smith Colleges
Elliott S. Goldstein, Arizona State University
Douglas Harrison, University of Kentucky
Don Hauber, Loyola University
Vincent Henrich, University of North Carolina, Greensboro
Philip L. Hertzler, Central Michigan University
Margaret Hollingsworth, SUNY–Buffalo
Rebecca Jann, Queens College
Mitrick A. Johns, Northern Illinois University
Paul F. Lurquin, Washington State University
Clint Magill, Texas A&M University
John McDonald, University of Delaware
Janet Morrison, The College of New Jersey
Harry Nickla, Creighton University
Amanda Norvell, The College of New Jersey
Berl R. Oakley, Ohio State University
Marcia O'Connell, The College of New Jersey
John C. Osterman, University of Nebraska–Lincoln
Dennis T. Ray, University of Arizona
Joseph Reese, Pennsylvania State University
Janice Rumph, Montana State University
Thomas F. Savage, Oregon State University
Cathy Schaeff, American University
Rodney Scott, Wheaton College
Thomas P. Snyder, Michigan Technological University
Paul Spruell, University of Montana
Christine Tachibana, University of Washington
Marty Tracey, Florida International University
Albrecht von Arnim, University of Tennessee
Laurence von Kalm, University of Central Florida
Tracy Whitford, East Stroudsburg University
Janice Rumph, Montana State University

La revisión de los medios incluyen a:

Peggy Brickman, University of Georgia
Carol Chihara, University of San Francisco
Karen Hughes, University of Tennessee
Cheryl Ingram-Smith, Clemson University
David Kass, Eastern Michigan University
John Kemner, University of Washington
Arlene Larson, University of Colorado
John C. Osterman, University of Nebraska, Lincoln
Eric Stavney, DeVry University

Gracias especiales a Mike Guidry de la LightCone Interative y a Karen Hughes de la University of Tennessee por sus originales contribuciones al programa de medios.

Como los anteriores reconocimientos dejan claro, un texto como éste es una empresa colectiva. Todas las personas anteriores merecen compartir cualquier éxito que tenga este texto. Deseamos que sepan que nuestra gratitud se iguala a la evidente extrema dedicación de su esfuerzo. Muchísimas gracias a todos ellos.

Editorial y producción

A Prentice Hall le manifestamos nuestro aprecio y alta estima por el consejo editorial de Sheri Snavely y Gary Carlson, cuyas ideas y esfuerzo han ayudado a dar forma y perfeccionar el aspecto de ésta y de anteriores ediciones del texto. Han trabajado sin descanso para proporcionarnos revisiones por especialistas punteros que también se han dedicado a la enseñanza y para asegurar que la pedagogía y el diseño del libro estén en primera línea en una disciplina que cambia rápidamente. Fuimos muy afortunados en beneficiarnos del valioso desarrollo editorial proporcionado por Anne Scanlan-Roher. También agradecemos los esfuerzos en la producción de Preparé Inc., cuya búsqueda por la perfección se refleja a lo largo del texto. En particular, Fran Daniele y Lorenza Compagnone proporcionaron una cantidad esencial de sentido común en el de otro modo caótico proceso de producción. Sin su honesto trabajo y dedicación, el texto nunca hubiera llegado a un buen resultado. Shari Meffert y Andrew Gilfillan han gestionado de manera entusiasta y profesional el marketing del texto. Crissy Dudonis, directora del proyecto biológico, ha trabajado sin descanso para asegurar que el libro, los suplementos y los medios interactivos actúen todos juntos sin fisuras. Patrick Shriner gestionó los medios para asegurar un gran énfasis para orientar las necesidades actuales de instructores y estudiantes. Finalmente, la hermosa y consistente presentación del trabajo artístico es el producto de Ar-

gosy, Artworks of York, PA y de Imagineering de Toronto. Damos particularmente las gracias a Patricia Burns, Jay McElroy y Heidi Bertignoll por sus esfuerzos.

Para los estudiantes

www.librosite.net/klug

En cuanto al cada vez más valioso tiempo de estudio para el estudiante se refleja en las características del Companion Website, que se ha diseñado para facilitar a los que utilizan la octava edición a centrarse en aquellas secciones y temas de los capítulos que necesitan revisar o ampliar. La Online Study Guide proporciona a los estudiantes una revisión centrada, sección por sección, de los temas tratados que presenta un escueto resumen de los puntos acompañado por ilustraciones clave y explorando preguntas de revisión que ofrece sugerencias y vueltas atrás. El Web Tutorials ofrece a los principiantes la oportunidad de visualizar rápida y adecuadamente temas complejos y procesos dinámicos- o simplemente volver a familiarizarse con conceptos que pudieron haber aprendido antes pero con los que se encuentran por primera vez en el contexto de un curso de genética. Se han añadido varios nuevos Seminarios Web a la octava edición para mantener los medios con el libro. La relación estricta de los medios con los principios y lecciones específicas del libro de texto significa que los estudiantes y los instructores pueden estar seguros de que el tiempo de estudio no se derrochará en ayudas que confundan a los estudiantes y subrayen temas ajenos. La etiqueta de medios en el margen de esta página aparece a lo largo del libro para indicarle cuando hay un Seminario Web sobre un tema relacionado con el que cubre el libro.

Ademas, en cada capítulo se ofrece un Media Lab en el Companion Website para aquellos que desean explorar la genética mas allá del límite del libro, mediante la abundante serie de recursos relacionados con la genética disponibles en la Red.

Libro del estudiante y manual de soluciones

Harry Nickla, Creighton University (0-13-149008-7)

Este valioso manual proporciona una detallada solución paso a paso o una extensa discusión de cada problema del texto. El manual también presenta ayudas adicionales al estudio incluyendo el estudio de problemas extra, resúmenes de capítulos, ejercicios de vocabulario y un resumen de cómo estudiar genética.

New York Times Themes of the Times: Genetics and Molecular Biology

Recopilado por Harry Nickla, Creighton University (0-13-186604-4)

Este interesante suplemento reúne artículos recientes sobre genética y biología molecular de las páginas del *New York Times*. Este suplemento gratuito, disponible en su representante local, anima a los estudiantes a conectar los conceptos genéticos con las últimas investigaciones y avances que encabezan el campo. Este recurso se pone regularmente al día.

«Research Navigator» www.researchnavigator.com

El Research Navigator™ de Prentice Hall da a sus estudiantes acceso a la información más corriente disponible en una amplia serie de sujetos a través de EBSCO's Conent Select™ Academia Journal Databse, The New York Times Search por Subject Archive, «Best of the Web» Link Library y la información sobre las ultimas noticias y acontecimientos corrientes. Esta valiosa herramienta ayuda a los estudiantes a encontrar los artículos y revistas mas útiles, fuente de citas y documentos escritos efectivamente para trabajo de investigación.

Seninario Web

Para el instructor

Centro de recursos del instructor en CD/DVD

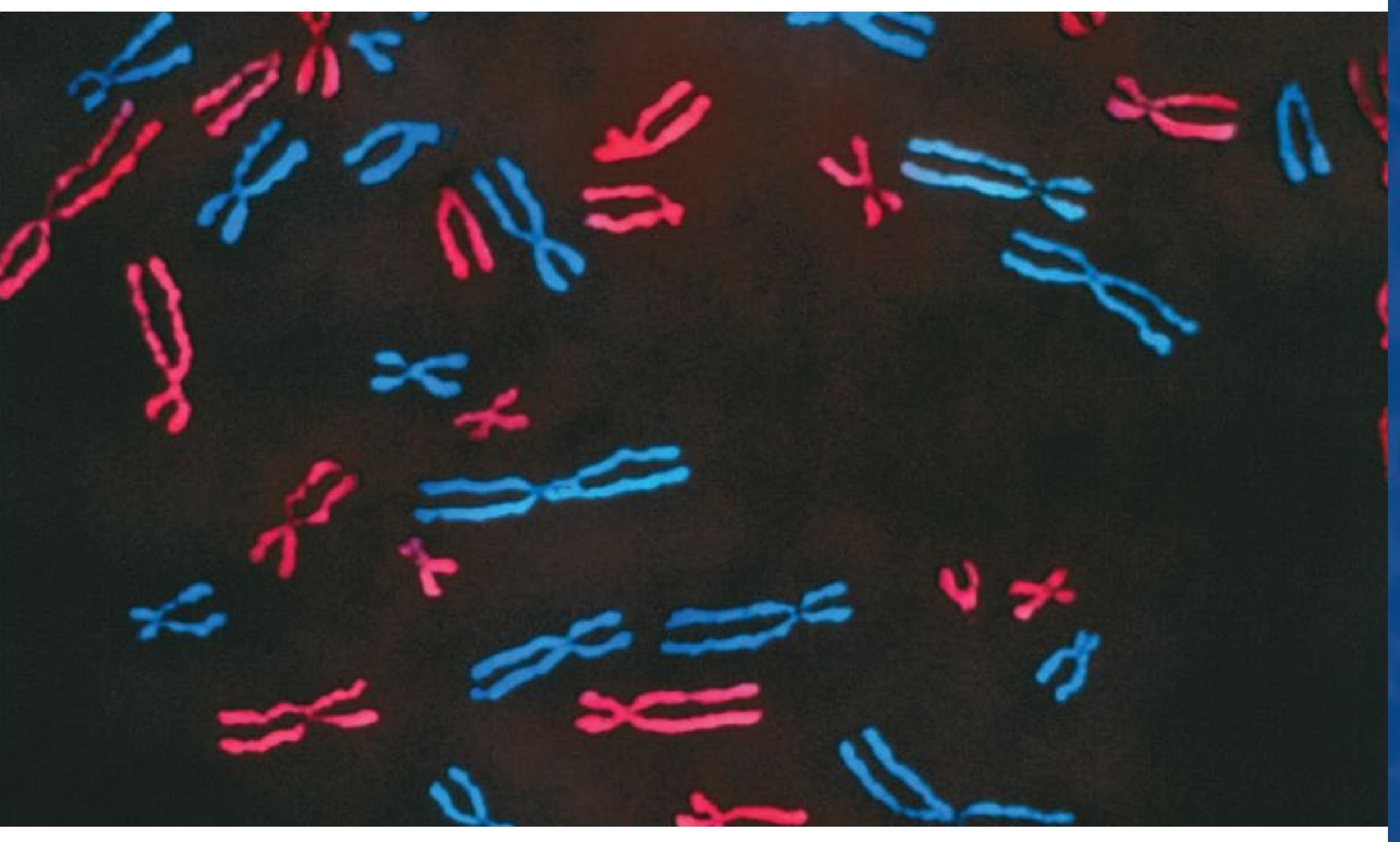
(0-13-149011-7)

El Centro de Recursos del Instructor en CD/DVD para la octava edición ofrece acceso convenientemente adaptados a la serie de lecturas mas comprensivas e innovadoras y de herramientas de enseñanza ofrecidas por cualquier libro de texto de genética. Desarrollado para satisfacer las necesidades tanto de veteranos como de nuevos instructores, estos recursos incluyen:

- Los archivos JPEG de todos los dibujos de los textos con etiquetas incrementadas individualmente para un resultado de proyección óptimo (asi como versiones sin etiquetas) y todas las tablas del texto.
- La mayoría de las fotos del texto, incluyendo todas las fotos con significado pedagógico, como archivos JPEG.
- Los archivos JPEG de los dibujos, fotos y tablas precargadas en las presentaciones PowePoint® de cada capítulo.
- Una segunda serie de presentaciones en PowerPoint® que constan de un bosquejo minucioso de la lectura de cada capítulo incrementado por ilustraciones clave del texto.
- Una impresionante serie de animaciones instructivas y concisas que añaden profundidad y claridad visual a los temas y procesos dinámicos mas importantes descritos en el texto.
- Las animaciones del instructor precargadas en el PowerPoint® de la presentación de archivos de cada capítulo.
- Presentaciones en PowerPoint® con una serie comprensiva de cuestiones para clase del Clasroom Response System (CRS) de cada capítulo.
- Archivos en Word, con una serie completa de materiales para evaluación y cuestiones de estudio y respuestas del Testbank, el texto de las cuestiones en los capítulos del texto, y las cuestiones prácticas de los media de los estudiantes, así como archivos que tienen el *Instructor's Manual and Solution Manual* completo.
- Finalmente, para ayudar a los instructores a seguir la ruta de todo lo que está disponible en este paquete de medios, una Media Integration Guide imprimible en formato PDF que enumera los medios que se ofrecen en cada capítulo.

Capítulo Uno

Introducción a la Genética



Cromosomas metafásicos humanos, cada uno formado por dos cromátidas hermanas unidas por un centrómero.

Conceptos del capítulo

- Utilizando plantas de guisante, Mendel desveló los principios fundamentales de la genética de la transmisión. El trabajo de otros demostró que los genes se encuentran en los cromosomas y que las cepas mutantes se puede utilizar para cartografiar genes en los cromosomas.
- El descubrimiento de que el DNA codifica la información genética y la resolución de la estructura del DNA y del mecanismo de la expresión génica constituyen el fundamento de la genética molecular.
- El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante revolucionó la genética y es el fundamento de la secuenciación del genoma, incluyendo al Proyecto del Genoma Humano.
- La biotecnología utiliza la técnica del DNA recombinante para producir bienes y servicios en muchas área, entre las que se encuentran la agricultura, la medicina y la industria. El uso de la biotecnología ha planteado muchos problemas legales y éticos que implican la patente de organismos genéticamente modificados y el uso de la terapia génica.
- Los organismos modelo se han utilizado en genética desde principios del siglo XX. El amplio conocimiento genético obtenido de estos organismos, acoplado con la tecnología del DNA recombinante y la genómica, hace útiles estos organismos como modelos para estudiar enfermedades humanas.
- La tecnología genética se está desarrollando más rápidamente que la política, las leyes y las convenciones en la utilización de esta tecnología. La educación y participación son elementos clave en el amplio uso de esta tecnología.

Desde nuestra perspectiva de principios del siglo XXI, podemos mirar hacia atrás y preguntarnos cuándo comenzó a afectar nuestras vidas la interacción entre la tecnología genética y la sociedad. ¿Comenzó cuando la tecnología del DNA recombinante se utilizó para producir insulina, cuando el primer alimento obtenido mediante ingeniería genética alcanzó un lugar en el mercado o cuando la terapia génica se utilizó por primera vez para tratar una enfermedad genética? Aunque cada uno de estos es un paso importante en la utilización del conocimiento genético que afecta a la sociedad, nos centraremos en un caso en donde el uso de la tecnología genética afecta a la ciudadanía de todo un país. Este caso capta cómo la genética tiene un impacto significativo en la sociedad y proporciona una idea de las implicaciones futuras cuando se hayan desarrollado más avances y aplicaciones.

En diciembre de 1998, comenzó a plantearse una controversia a los 270.000 habitantes de Islandia. Después de meses de acalorado debate, el parlamento islandés aprobó una ley otorgando a deCODE, una compañía de biotecnología con sede en Islandia, una licencia para crear y manejar una base de datos llamada IHD (Icelandic Health Sector Database) con información detallada codificada (para asegurar el anonimato) de los registros médicos de todos los residentes de Islandia. La ley también permitía a deCODE referencias cruzadas sobre la información médica del IHD con una amplia base de datos genealógicos de los archivos nacionales. Además, deCODE puede correlacionar información en estas dos bases de datos con los resultados de los perfiles de DNA obtenidos de donantes islandeses. La combinación de enfermedad, genealogía y genética es un recurso potente, disponible exclusivamente para deCODE, que puede vender esta información a investigadores y compañías por un periodo de 12 años.

Éste no es un argumento para una película como *Gattaca*, sino un caso real de la interacción en curso entre la genética y la sociedad cuando comenzamos un nuevo siglo. El desarrollo y uso de estas bases de datos en Islandia ha incitado a la creación de proyectos similares en otros países. El mayor empeño es el del «UK Biobank», iniciado en Gran Bretaña en 2003. Allí, una enorme base de datos con información genética de 500.000 británicos, se compilará a partir de un grupo inicial de 1,2 millones de residentes. La base de datos se utilizará para investigar genes de susceptibilidad que controlan caracteres complejos.

Proyectos similares para desarrollar bases datos a nivel nacional se han anunciado en Estonia, Lituania, Suecia, Singapur y el Reino de Tonga, lo que ilustra el impacto global de la tecnología genética.

En los Estados Unidos, programas a menor escala que implican a decenas de miles de individuos se están desarrollando en la Clínica Marshfield, en Marshfield, Wisconsin; en la Universidad Northwestern de Chicago, Illinois y en la Universidad Howard en Washington, D.C.

¿Por qué deCODE seleccionó Islandia para tal proyecto? Por varias razones, el pueblo islandés es una caso único de uniformidad genética, que raramente se ve o es accesible a la investigación científica. Este alto grado de parentesco genético viene de la repoblación de Islandia hace unos 1.000 años por una pequeña población fundadora de origen principalmente escandinavo y celta, de las reducciones poblacionales periódicas por enfermedades y desastres naturales que redujo todavía mas la diversidad genética y, hasta hace pocas décadas, de la escasez de inmigrantes que introdujeran nuevos genes en la población. Así, para los genéticos que intentan identificar genes que controlan enfermedades complejas, la población islandesa tiene una tremenda ventaja. Debido al sistema de atención sanitaria estatal, existen registros médicos de todos los residentes desde principios del siglo XX. La información genealógica esta disponible en los Archivos Nacionales y eclesiales de casi todos los residentes y de más de 500.000 individuos de los 750.000 estimados que siempre han vivido en Islandia. A pesar de la controversia asociada, el proyecto ya ha tenido cierto número de éxitos en su honor. Los científicos de deCODE han identificado genes asociados con mas de 25 de las enfermedades mas corrientes, como el asma, infartos cardíacos, apoplejía y osteoporosis.

En el reverso de estos éxitos hay temas sobre la privacidad, el consentimiento y la comercialización –temas en el centro de muchas controversias que surgen de la aplicación de la tecnología genética. Los científicos, e igualmente los no científicos, están considerando el destino y control de la información genética a medida que se adquiere, y el papel de la ley y de la sociedad en las decisiones acerca de cómo y cuándo utilizar la tecnología genética. Por ejemplo, ¿cómo se debe usar el conocimiento de la secuencia nucleotídica completa del genoma humano? Más que en cualquier otro momento de la historia de la ciencia, encarar las cuestiones éticas que rodean a la tecnología emergente es ahora tan importante como la información que se obtiene de dicha tecnología.

Cuando comience Vd. el estudio de la genética, sea sensible a cuestiones y temas como los que acabamos de describir. Nunca ha habido un momento tan excitante para formar parte de la ciencia, pero nunca ha sido más notoria la necesidad de prudencia y conocimiento de los temas sociales. Este texto le capacitará para lograr una comprensión profunda de la genética actual y de sus principios subyacentes. A lo largo del camino, disfrute de su estudio, pero admita muy seriamente su responsabilidad como genético principiante.

1.1 De Mendel al DNA en menos de un siglo

Ya que los procesos genéticos son esenciales para la comprensión de la vida misma, muchos piensan que la disciplina de la genética se asienta en el centro de la biología. La información genética dirige la función celular, determina en gran medida la apariencia externa de los organismos y sirve de unión entre generaciones en todas las especies. En sí mismo, el conocimiento genético es esencial para la comprensión completa de otras

disciplinas, como la biología molecular, la biología celular, fisiología, evolución, ecología, sistemática y etología. Por consiguiente, la genética unifica la biología y constituye su núcleo. Así, no es sorprendente que la genética tenga una larga y rica historia. Nuestro punto de partida para esta historia es el jardín de un monasterio en la Europa central de la década de 1860.

El trabajo de Mendel sobre la transmisión de los caracteres

En este jardín (Figura 1.1) Gregor Mendel, un monje agustino, realizó durante una década una serie de experimentos utilizando el guisante. En su trabajo, Mendel demostró que los caracteres pasan de padres a hijos de una manera predecible. De su trabajo concluyó que los caracteres de los guisantes, como la altura de la planta y el color de la flor, están controlados por unidades hereditarias discretas que ahora llamamos **genes**. Además concluyó que los genes que controlan un carácter están en parejas, y que los miembros de cada pareja se separan en la formación de los gametos. Su trabajo se publicó en 1866, pero fue en gran parte ignorado hasta que fue parcialmente reproducido y citado en artículos por Carl Correns y otros alrededor de 1900. Habiéndose confirmado por otros, los hallazgos de Mendel se reconocieron como la base de la transmisión de los caracteres en el guisante y en todos los organismos superiores. Su trabajo constituye el fundamento de la **genética**, que se define como la rama de la biología que trata del estudio de la herencia y la variación.



FIGURA 1.1 El jardín del monasterio en donde Gregor Mendel realizó sus experimentos con el guisante de jardín. En 1866, Mendel desarrolló los postulados principales de la genética de la transmisión.

La teoría cromosómica de la herencia: Conectando Mendel y meiosis

Mendel hizo su trabajo antes de que se conociera la estructura y el papel de los cromosomas. Unos veinte años después de su trabajo, los avances en microscopía permitieron a los investigadores identificar a los cromosomas (Figura 1.2) y establecer que en los organismos eucariotas (que tienen núcleo y sistema membranoso celular), cada especie tiene un número característico de cromosomas denominado el **número diploide (2*n*)**. Por ejemplo, los humanos tienen un número diploide de 46 (Figura 1.3). En las células diploides los cromosomas se



FIGURA 1.2 Imagen coloreada de cromosomas mitóticos humanos, visualizados con el microscopio electrónico de barrido.

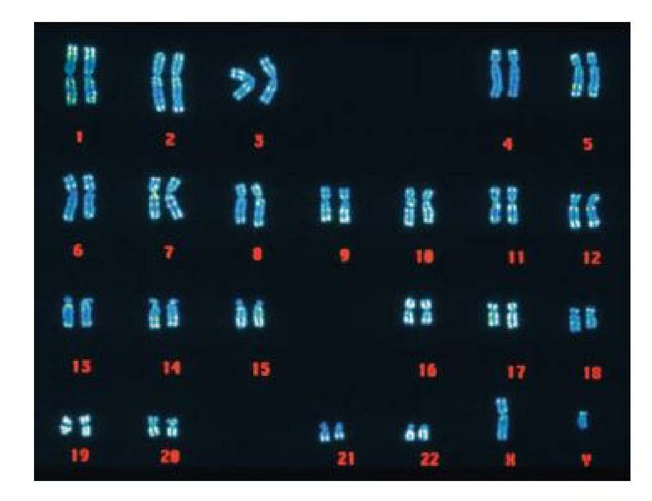


FIGURA 1.3 Imagen coloreada de la dotación cromosómica de un varón. Dispuestos de esta manera, la dotación se denomina cariotipo.

encuentran formando parejas, llamados **cromosomas homólogos**. Los miembros de cada pareja son idénticos en tamaño y situación del centrómero, una estructura a la que se enganchan las fibras del huso en la división.

Además, los investigadores de las últimas décadas del siglo XIX describieron el comportamiento de los cromosomas en las dos formas de división celular, la **mitosis** y la **meiosis**. En la mitosis (Figura 1.4), los cromosomas se copian y se distribuyen de tal manera que cada una de las dos células hijas resultantes reciben una dotación diploide de cromosomas. La meiosis es una forma de división celular asociada con la formación de los gametos en los animales y de las esporas en muchos vegetales. Las células producidas por meiosis reciben una sola copia de cada cromosoma, llamado el **número haploide (*n*)** de cromosomas. Esta reducción en el número de cromosomas es esencial si los descendientes que surgen de dos gametos tienen que mantener el número constante de cromosomas característico de sus padres y de otros miembros de su especie.

A principios del siglo XX, Walter Sutton y Theodore Boveri advirtieron, independientemente, que los genes y los cromosomas tienen propiedades en común y que el comportamiento de los cromosomas en la meiosis es idéntico al comportamiento de los genes durante la formación de los gametos. Por ejemplo, los genes y los cromosomas se encuentran formando parejas y los miembros de un par de genes y los miembros de un par de cromosomas se separan durante la formación de los gametos. Basándose en estos paralelismos, propusieron que los genes son transportados por los cromosomas (Figura 1.5). Esta propuesta es la base de la **teoría cromosómica de la herencia**, que afirma que los caracteres hereditarios están controlados por genes que residen en los cromosomas, que son fielmente transmitidos a través de los gametos, manteniendo la continuidad genética de generación en generación.

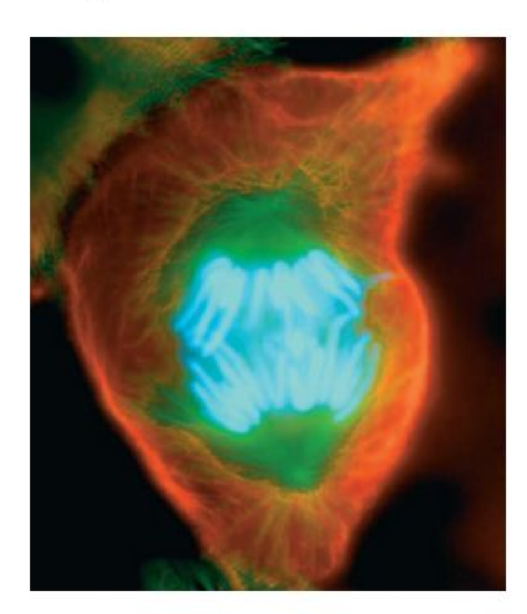


FIGURA 1.4 Estadio de la mitosis (anafase) cuando los cromosomas (teñidos de azul) se separan.

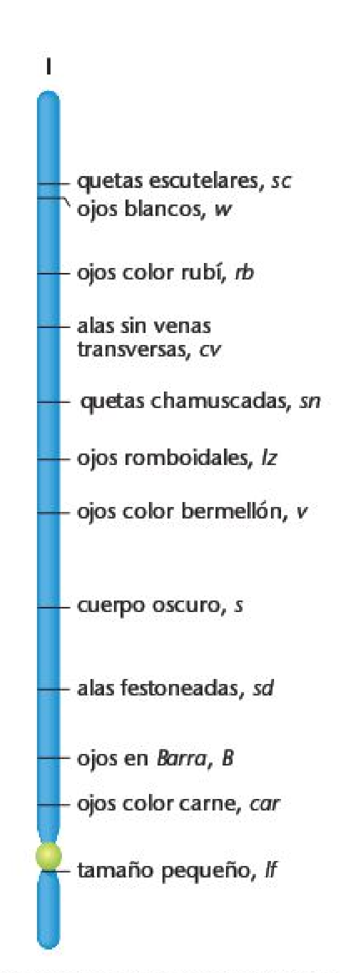


FIGURA 1.5 Cromosoma I (cromosoma X) de *D. melanogaster*, mostrando la localización de muchos genes. Los cromosomas pueden contener cientos de genes.

Variación genética

Al mismo tiempo que se propuso la teoría cromosómica de la herencia, los científicos comenzaron el estudio de la herencia de caracteres en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Muy pronto se descubrió una mosca con ojos blancos (Figura 1.6) en una botella que tenía moscas normales con ojos rojos (tipo silvestre). Esta variación se había producido por **mutación**, un cambio heredable en el gen que controla el color del ojo. Las mutaciones cromosómicas afectan al número y estructura de los cromosomas. La mutaciones, génicas o cromosómicas, se definen como cambios heredables y son la fuente de toda la variación genética.

La variante génica descubierta en *Drosophila* es un **alelo** del gen para el color del ojo. Los alelos se definen como formas alternativas de un gen. Diferentes alelos pueden producir diferencias en los rasgos observables, o **fenotipo** de un organismo. La dotación de alelos que lleva un organismo para un carácter dado se denomina **genotipo**. Utilizando genes mutantes como marcadores, los genéticos han sido capaces de cartografiar la localización de los genes en los cromosomas.

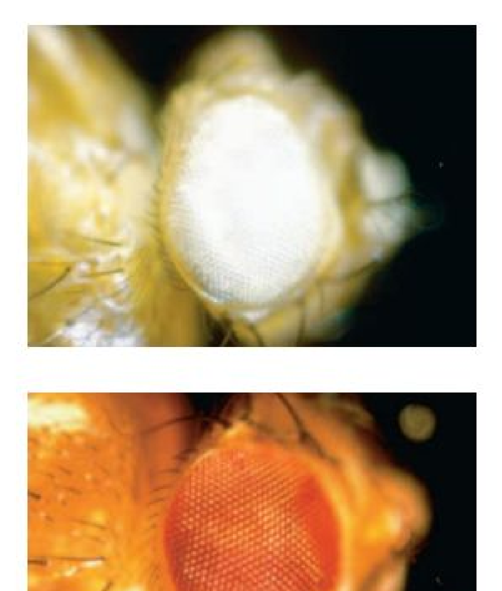


FIGURA 1.6 El color rojo normal del ojo en *Drosophila* (abajo) y el mutante de ojos blancos (arriba).

La investigación de la naturaleza química de los genes: ¿DNA o proteínas?

El trabajo sobre los ojos blancos de *Drosophila* demostraba que el carácter mutante tenía un patrón de herencia que podía atribuirse a un único cromosoma, confirmando la idea de que los genes se encuentran en los cromosomas. Una vez sabido esto, los investigadores centraron su atención en identificar cuál era el componente químico de los cromosomas que lleva la información genética. Hacia la década de 1920, se identificaron el DNA y las proteínas como los principales componentes químicos de los cromosomas. Las proteínas son los componentes mas abundantes de las células. Hay un gran número de proteínas distintas y debido a su distribución universal en el núcleo y en el citoplasma, muchos investigadores creyeron que las proteínas podrían ser las portadoras de la información genética.

En 1944, Avery, MacLeod y McCarty, tres investigadores del Instituto Rockefeller de Nueva York, aportaron pruebas experimentales de que el DNA era el portador de la información genética en las bacterias. Esta evidencia, aunque clara, no convenció a muchos científicos influyentes. Pruebas adicionales del papel del DNA como portador de la información genética vinieron de otros investigadores que trabajaban con virus que infectan y matan a la bacteria *Escherichia coli* (Figura 1.7). Uno de estos virus, llamado **bacteriófago**, o brevemente **fago**, consta de una cubierta proteica que rodea al DNA. Estos experimentos demostraron que la cubierta proteica del virus se queda fuera de la célula, mientras que el DNA entra en la célula y dirige la síntesis y construcción de mas fagos. Este trabajo fue una

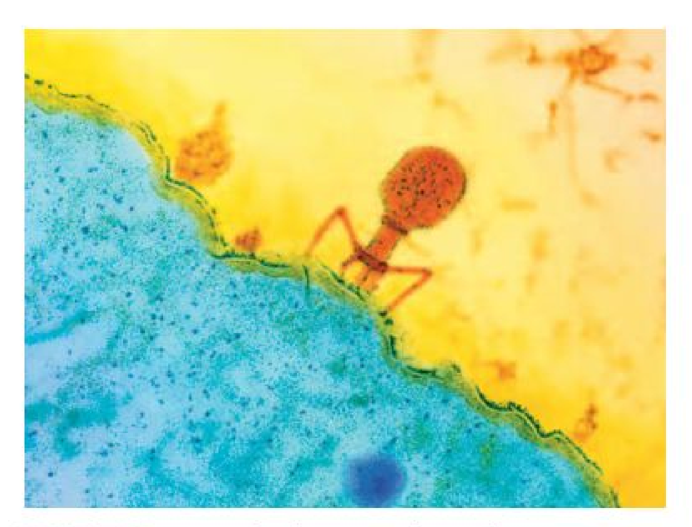


FIGURA 1.7 Micrografía electrónica de una fago T infectando a la bacteria *E. coli.*

prueba más de que el DNA lleva la información genética. Nuevos experimentos en los siguientes años proporcionaron pruebas sólidas de que el DNA, y no las proteínas, es el material genético, sentando las bases del trabajo para establecer la estructura del DNA.

1.2 El descubrimiento de la doble hélice inició la era del DNA recombinante

Una vez que se aceptó que el ácido nucleico en la forma del DNA lleva la información genética, los esfuerzos se centraron en descifrar la estructura del DNA, y el mecanismo mediante el cual la información almacenada en esta molécula se expresa para dar lugar al fenotipo observable. Esto se consiguió en los años siguientes; los investigadores aprendieron cómo aislar y hacer copias de regiones específicas de la molécula de DNA, abriendo el camino para la era de la tecnología del DNA recombinante.

La estructura del DNA y del RNA

El DNA es una molécula larga, como en escalera, que forma una doble hélice. Cada cadena de la hélice es una molécula lineal formada por subunidades llamadas **nucleótidos**. En el DNA hay cuatro nucleótidos diferentes. Cada nucleótido del DNA tiene una de las cuatro bases nitrogenadas —A (adenina), G (guanina), T (timina) o C (citosina). Estas cuatro bases constituyen el alfabeto genético, o **código genético**, que en distintas combinaciones especifica finalmente la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Uno de los grandes descubrimientos del siglo xx fue llevado a cabo en 1953 por James Watson y Francis Crick, que establecieron que las dos cadenas del DNA son complementarias entre si, de tal manera que los peldaños de la escalera de la doble hélice constan de los pares de

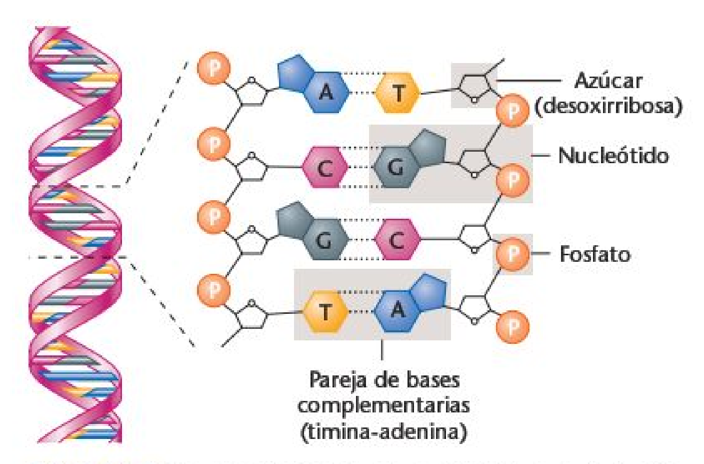


FIGURA 1.8 Esquema de la estructura del DNA, que ilustra la naturaleza de la doble hélice (a la izquierda) y los componentes químicos que forman cada cadena (a la derecha).

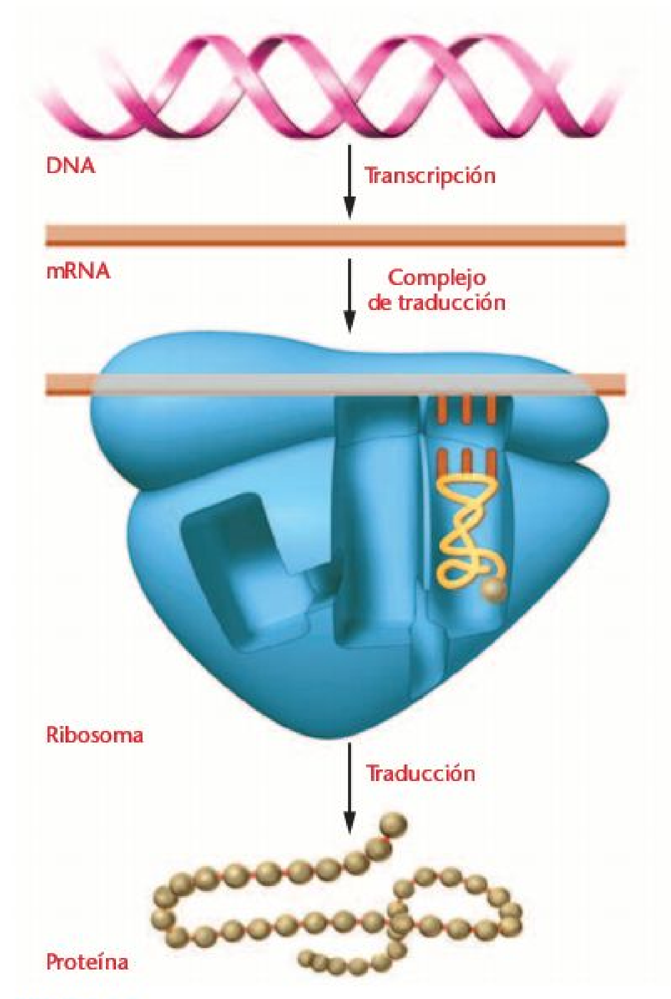


FIGURA 1.9 La expresión génica implica la transcripción del DNA a mRNA (arriba) y la traducción (centro) del mRNA en un ribosoma a proteína (abajo).

bases A═T o G≡C. Como veremos en un capítulo posterior, esta **relación complementaria** entre adenina y timina y entre guanina y citosina es esencial para la función génica. Esta relación sirve de base tanto para la replicación del DNA como para la expresión génica. Durante ambos procesos, las cadenas del DNA sirven de molde para la síntesis de moléculas complementarias. En la Figura 1.8 se muestran dos representaciones de la estructura y de los componentes del DNA.

El RNA, otro ácido nucleico, es químicamente similar al DNA. El RNA tiene en sus nucleótidos un azúcar diferente (la ribosa en lugar de la desoxirribosa), y la base nitrogenada uracilo en lugar de la timina. Además, en contraste con la doble hélice del DNA, el RNA es en general de cadena sencilla. Es muy importante que pueda formar estructuras complementarias con una cadena del DNA.

Expresión génica: Del DNA al fenotipo

Como se advirtió anteriormente, la complementariedad es la base para la gestión de la expresión génica. Este proceso comienza con la **transcripción** de la información química del DNA en RNA (Figura 1.9). Una vez que se ha transcrito una molécula de RNA complementaria a una de las cadenas del DNA, el RNA dirige la síntesis de las proteínas. Esto se realiza cuando el RNA —llamado **RNA mensajero** o **mRNA**— se une a un **ribosoma**. La síntesis de las proteínas bajo la dirección del RNA se denomina **traducción** (parte inferior de la Figura 1.9). Las proteínas, como producto final de los genes, son polímeros formados por monómeros de aminoácidos. Hay 20 aminoácidos diferentes en los seres vivos.

¿De qué manera la información contenida en el RNA dirige la inserción de aminoácidos específicos en las cadenas de proteínas cuando están siendo sintetizadas? La respuesta es ahora muy clara. El **código genético** consiste en una serie lineal de tripletes de nucleótidos presentes en las moléculas de mRNA. Cada triplete refleja la información almacenada en el DNA y especifica la inserción de un aminoácido concreto en la cadena de proteína en crecimiento. Esto se realiza por la acción de moléculas adaptadoras llamadas **ARN de transferencia** (**tRNA**). Dentro del ribosoma, los tRNA reconocen la información codificada en los tripletes del mRNA y especifican el aminoácido adecuado para su inserción en la proteína durante la traducción.

Como la discusión anterior muestra, el DNA fabrica RNA, que muy a menudo fabrica proteínas. Estos procesos, conocidos como el **dogma central** de la genética, se dan con gran especificidad. Utilizando un alfabeto de sólo cuatro letras (A, T, C y G), los genes dirigen la síntesis de proteínas altamente específicas que en conjunto sirven de base para todas las funciones biológicas.

Las proteínas y la función biológica

Como hemos mencionado, las proteínas son los productos finales de la expresión génica. Estas moléculas son responsables de conferir las propiedades que atribuimos a los seres vivos. La naturaleza diversa de la función biológica descansa en el hecho

de que las proteínas se fabrican a partir de 20 aminoácidos diferentes. En una cadena proteica de unos 100 aminoácidos de longitud, en cada posición puede haber cualquiera de los 20 aminoácidos; el número de proteínas distintas con 100 aminoácidos, cada una con una secuencia única, es igual a

$$20^{100}$$

Ya que 20^{10} es algo mas de 10 billones, imagine cuán grande es 20^{100}! Obviamente, la evolución se ha aprovechado de una clase de moléculas con un potencial enorme de diversidad estructural para que sirvan de sostén principal a los sistemas biológicos.

La clase más numerosa de proteínas son las **enzimas** (Figura 1.10). Estas moléculas son catalizadores biológicos que esencialmente permiten que las reacciones biológicas se produzcan a un ritmo que sustente la vida en las condiciones que existen en la Tierra. Disminuyendo la energía de activación de las reacciones, el metabolismo puede darse bajo la dirección de las enzimas a la temperatura corporal.

Hay incontables proteínas distintas de las enzimas que son componentes esenciales de las células y de los organismos. Entre estas se encuentra la **hemoglobina**, el pigmento de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno; la **insulina**, hormona pancreática; el **colágeno**, molécula del tejido conjuntivo; la **queratina**, molécula estructural del pelo; las **histonas**, proteínas de la estructura de los cromosomas en eucariotas; la **actina** y la **miosina**, proteínas contráctiles del músculo y las **inmunoglobulinas**, los anticuerpos del sistema inmune. El potencial para tan diversas funciones descansa en la enorme variación de la estructura tridimensional de las proteínas. Esta estructura viene determinada por la secuencia lineal de aminoácidos que constituyen la molécula. Para cerrar el círculo, esta secuencia viene dictada por la información almacenada en el DNA de un gen que se transfiere al RNA, el cual dirige la síntesis de las proteínas. El DNA fabrica RNA que luego fabrica proteínas.

Conexión entre genotipo y fenotipo: la anemia falciforme

Una vez que se ha sintetizado la proteína, su acción o localización en la célula juega un papel en la producción de un fenotipo. Cuando la mutación altera un gen, puede eliminar o alterar la función de la proteína, y dar lugar a un fenotipo alterado. Para seguir la cadena de sucesos que llevan de la síntesis de una proteína al fenotipo, examinaremos la anemia falciforme, un trastorno genético humano. La anemia falciforme está ocasionada por una forma mutante de hemoglobina, la proteína que transporta el oxígeno desde los pulmones a las células del cuerpo (Figura 1.11). La hemoglobina es una molécula compuesta de dos proteínas distintas, la α-globina y la β-globina, codificada cada una por un gen distinto. Cada molécula de hemoglobina funcional tiene dos cadenas de α-globina y dos de β-globina. En la anemia falciforme, una mutación en el gen que codifica la β-globina da lugar a la sustitución de 1 aminoácido de los 146 de la proteína. La Figura 1.12 muestra parte de la secuencia del DNA, los codones del mRNA y la secuencia de aminoácidos de las formas normal y mutante de la β-globina. Advierta que en la anemia falciforme, la mutación implica el cambio de un nucleótido del DNA, haciendo que el codón 6 del mRNA pase de GAG a GUG, que a su vez cambia en la β-globina el aminoácido número 6 de ácido glutámico a valina. Los otros 145 aminoácidos de la proteína no cambian por esta mutación.

FIGURA 1.10 Conformación tridimensional de una proteína. La secuencia de aminoácidos de la proteína se representa como una cinta.



FIGURA 1.11 La molécula de hemoglobina, mostrando las dos cadenas alfa y las dos cadenas beta. Una mutación en el gen para la cadena beta da lugar a moléculas de hemoglobina anormales y a la anemia falciforme.

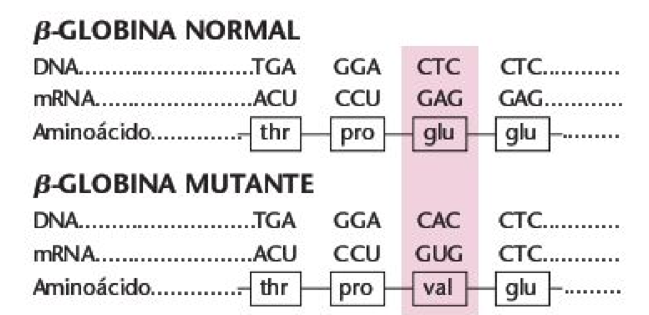


FIGURA 1.12 El cambio en un solo nucleótido del DNA en el gen que codifica a la β-globina (CTC → CAC) da lugar a un codón alterado en el mRNA (GAG → GUG) y a la inserción de un aminoácido diferente (glu → val), produciendo una versión alterada de la proteína β-globina, dando lugar a la anemia falciforme.

Los individuos con dos copias mutantes del gen de la β-globina tienen anemia falciforme. La mutación da lugar a que las moléculas de hemoglobina de los glóbulos rojos polimericen cuando la concentración de oxígeno es baja, formando largas cadenas que distorsionan la forma del glóbulo rojo (Figura 1.13). Cuando los glóbulos rojos son falciformes, bloquean el flujo de sangre en los capilares y en los vasos pequeños, ocasionando graves daños a los tejidos, al corazón, al cerebro, a los músculos y a los riñones. La anemia falciforme puede provocar ataques del corazón y apoplejía y puede ser fatal si no se trata. Además, las células sanguíneas deformadas se lisan fácilmente, provocando anemia al reducirse el número de glóbulos rojos en circulación. Así, todos los síntomas de esta enfermedad están ocasionados por el cambio de un solo nucleótido en un gen que cambia un aminoácido de los 146 de la molécula de β-globina, subrayando la íntima relación entre genotipo y fenotipo.

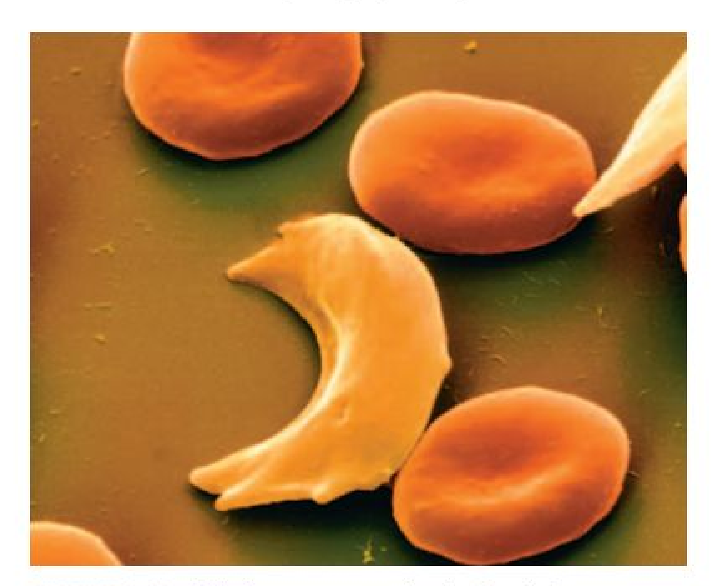


FIGURA 1.13 Glóbulos rojos normales (redondos) y falciformes. Los glóbulos falciformes bloquean los capilares y los pequeños vasos sanguíneos.

El gen de la β-globina no se expresa hasta pocos días después del nacimiento, por lo que la proteína mutante no se puede detectar antes del nacimiento. Sin embargo, utilizando la tecnología del DNA recombinante, se puede detectar el *gen* mutante antes del nacimiento. Además, también se pueden determinar los genotipos de los familiares y de otros, haciendo posible que las personas sepan si son portadoras de una copia mutante del gen y si tienen riesgo de tener hijos afectados.

1.3 La genómica tuvo su origen en la tecnología del DNA recombinante

La era del DNA recombinante comenzó a principios de la década de 1970, cuando los investigadores descubrieron que las bacterias se protegen de la infección de los virus sintetizando enzimas que restringen o previenen la infección cortando el DNA vírico en puntos específicos. Una vez roto, el DNA vírico no puede dirigir la síntesis de más partículas del fago, que cuando se liberan, matan la célula bacteriana infectada. Los científicos se dieron cuenta rápidamente de que tales enzimas, llamadas **enzimas de restricción**, podrían utilizarse para cortar el DNA de cualquier organismo en secuencias nucleotídicas específicas, dando lugar a una serie de fragmentos de manera reproducible. Esta fue la base para el desarrollo de la clonación, que consiste en producir un gran número de copias de estos fragmentos de DNA.

Fabricando moléculas de DNA recombinante y clonando el DNA

Muy poco después de descubrirse que las enzimas de restricción se podían usar para producir fragmentos de DNA específicos, se desarrollaron métodos para insertar dichos fragmentos en moléculas de DNA portadoras, llamadas vectores, y transferir la combinación del vector con el fragmento de DNA (una molécula de **DNA recombinante**) a una bacteria en donde se producen cientos o miles de copias, o **clones**, del vector y de los fragmentos de DNA (Figura 1.14). Estas copias clonadas se pueden recuperar de las bacterias y aislarse grandes cantidades del fragmento de DNA clonado. Una vez que se obtuvieron por clonación de grandes cantidades de fragmentos de DNA específicos, se utilizaron de muchos modos distintos: para aislar genes, para estudiar su organización y expresión y para estudiar su secuencia nucleotídica y evolución. Además de preparar grandes cantidades de DNA específico para investigación, las técnicas de DNA recombinante fueron el fundamento de la industria biotecnológica (descrita en la siguiente sección de este capítulo).

A medida que las técnicas se fueron perfeccionando, fue posible clonar fragmentos de DNA cada vez mayores, preparando el camino para clonar el **genoma** de un organismo, que abarca a todo el DNA que tiene un organismo. La colección de clones que contiene un genoma completo se denomina biblioteca genómica. En la actualidad se dispone de bibliotecas genómicas de cientos de organismos.

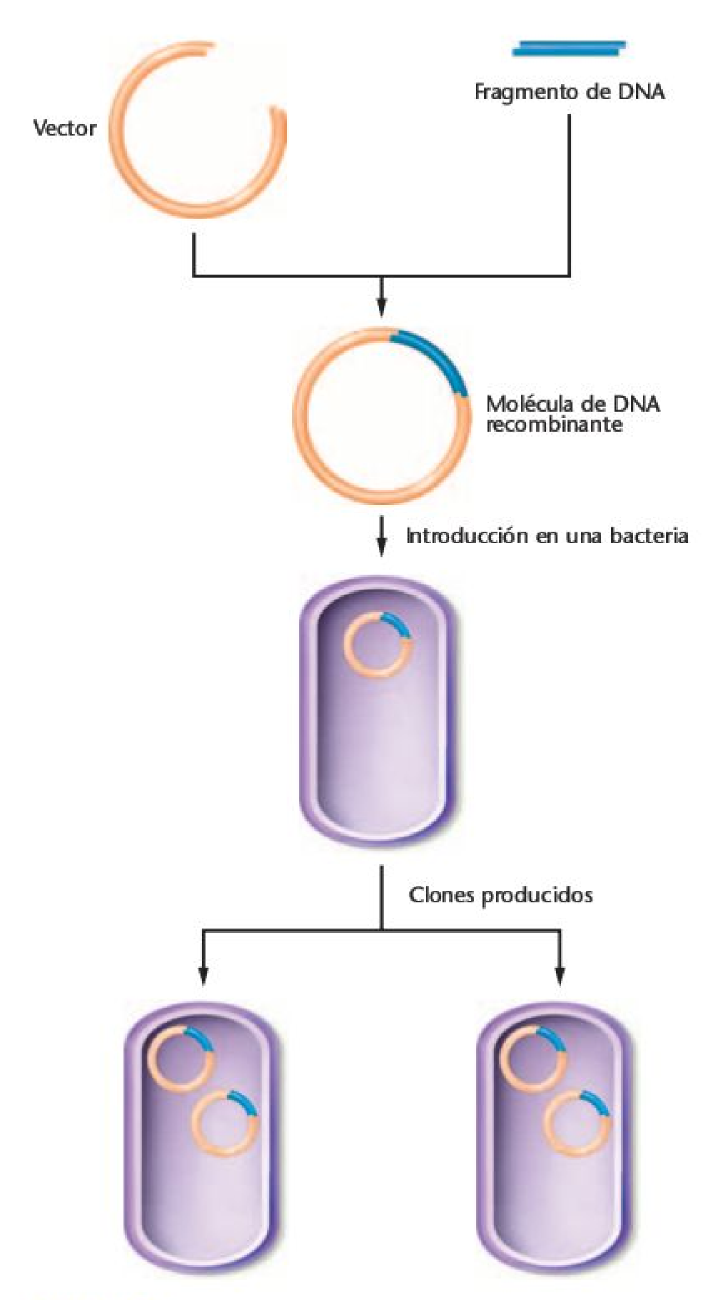


FIGURA 1.14 En la clonación, un vector y un fragmento de DNA, producido al cortar con enzimas de restricción, se unen para producir una molécula de DNA recombinante, que se transfiere a una bacteria, en donde se clona produciendo muchas copias por replicación de la molécula recombinante y por división de la bacteria.

Secuenciación de genomas: el Proyecto Genoma Humano

Una vez que se dispuso de bibliotecas genómicas, los científicos comenzaron a considerar la forma de secuenciar todos los clones de una biblioteca genómica de un modo organizado para obtener la secuencia nucleotídica del genoma de un organismo. El Proyecto Genoma Humano comenzó en 1990 como un esfuerzo internacional, patrocinado federalmente, para secuenciar el genoma humano y los genomas de varios organismos modelo utilizados en la investigación genética. Por las mismas fechas, se iniciaron otros proyectos genómicos, patrocinados por la industria. El primer genoma de un organismo de vida libre, una bacteria (Figura 1.15), se secuenció y se publicó en 1995 por científicos de una compañía de biotecnología.

En 2001, el consorcio público del Proyecto Genoma Humano y un proyecto genómico privado acometido por «Celera Corporation», publicaron el primer borrador de la secuencia del genoma humano, que cubría cerca del 96 por ciento de la parte del genoma que tiene genes. En 2003, se completó y publicó la secuencia de los genes que quedaban. El trabajo se centra ahora en la secuenciación de regiones no codificantes del genoma. Al mismo tiempo, también se secuenciaron los genomas de cinco organismos, utilizados en investigación genética, *Escherichia coli* (bacteria), *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), *Caenorhabditis elegans* (nemátodo), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Mus musculus* (ratón)

A medida que se multiplicaron los proyectos genómicos y se depositaron mas genomas secuenciados en las bases de datos, surgió una nueva disciplina para el estudio de los genomas, la **genómica**. La genómica utiliza la información de las secuencias nucleotídicas de las bases de datos para estudiar la estructura, función y evolución de los genes y de los genomas. La genómica esta cambiando drásticamente la biología, desde una ciencia basada en el laboratorio a una combinación de experimentos de laboratorio con tecnología de la información. Los genéticos y otros biólogos pueden utilizar la información de las bases de datos, que disponen de secuencias de ácidos nucleicos, proteínas y redes de interacciones génicas, para contestar cuestiones experimentales en cuestión de minutos, en lugar de meses o años.

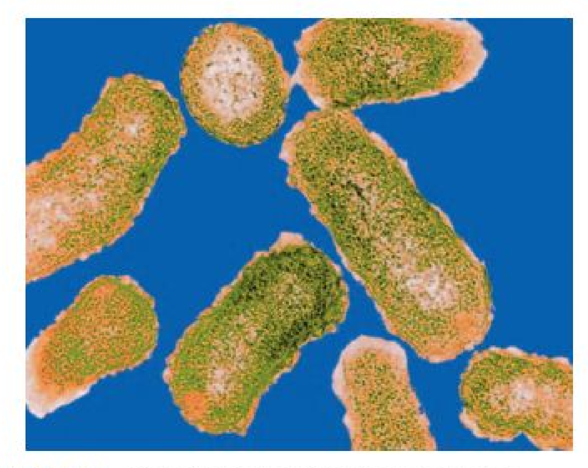


FIGURA 1.15 Micrografía electrónica coloreada de *Haemophilus influenzae*, bacteria que fue el primer organismo de vida libre cuyo genoma se secuenció. Esta bacteria da lugar a infecciones respiratorias y meningitis en humanos.

La tecnología del DNA recombinante no solo ha acelerado enormemente el ritmo de la investigación, dando lugar a nuevos campos de estudio como proyectos genoma y genómicos, sino que también ha potenciado a la industria biotecnológica, que ha crecido en los últimos 25 años para convertirse en una parte importante de la economía de los EE.UU.

1.4 El impacto de la biotecnología está creciendo

Discretamente y sin llamar la atención, los productos y servicios biotecnológicos se están introduciendo y están revolucionando muchos aspectos de la vida diaria en los Estados Unidos. La especie humana ha utilizado microorganismos, vegetales y animales durante miles de años, pero el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y las técnicas asociadas nos permiten modificar genéticamente a los organismos de nuevos modos y utilizarlos, a ellos o a sus productos, para mejorar nuestra vida. La biotecnología es el uso comercial de estos organismos modificados o de sus productos. Se encuentra en el supermercado, en los despachos de los médicos, en farmacias, grandes almacenes, hospitales y clínicas, granjas, invernaderos, observancia de la ley, apoyo a los niños por orden judicial e incluso en industrias químicas. Examinaremos el impacto de la biotecnología en ciertos aspectos de la vida diaria.

Vegetales, animales y suministro de alimento

La modificación genética de plantas cultivadas es una de las áreas de la biotecnología que ha tenido una más rápida expansión. La atención se ha centrado en caracteres como la resistencia a herbicidas, a insectos y a virus, el incremento en el contenido de aceite y otros (Tabla 1.1). Actualmente, en los Estados Unidos se han aprobado para uso comercial alrededor de una docena de plantas cultivadas modificadas genéticamente, con muchas más en los campos de ensayo. El maíz y la soja resistente a herbicidas se cultivaron por primera vez hacia mediados de 1990, y en la actualidad, cerca del 40 por ciento de la cosecha de maíz y del 80 por ciento de la de soja están genéticamente modificadas. Además, más del 60 por ciento de la cosecha de canola y del 70 por ciento del algodón se cultivan de cepas genéticamente modificadas. Se estima que más del 60 por ciento del alimento procesado en los Estados Unidos tiene ingredientes de plantas cultivadas modificadas genéticamente.

Esta transformación agrícola no se ha producido sin controversia. Las críticas se refieren a que el uso de vegetales resistentes a herbicidas dará lugar a la dependencia de los herbicidas en la gestión de las malas hierbas y finalmente puede dar lugar a malas hierbas resistentes a herbicidas. Otros avisan de que los caracteres de las plantas modificadas genéticamente podrían pasar a plantas silvestres de una manera que diera lugar a cambios irreversibles en los ecosistemas. Examinaremos estos temores en el Capítulo 22.

La biotecnología también se está usando para mejorar nutritivamente a las plantas cultivadas. Más de la tercera parte de la población mundial utiliza el arroz como dieta de primera necesidad, pero muchas variedades de arroz tienen poca o ninguna vitamina A. La deficiencia en vitamina A es el origen de más de 500.000 casos de ceguera en los niños cada año. Una cepa genéticamente modificada, llamada arroz «golden», tiene niveles elevados de los dos compuestos que el organismo transforma en vitamina A. En la actualidad se está ensayando el arroz «golden», que estaría disponible para su siembra en un futuro cercano y la intención es reducir o eliminar esta carga de enfermedad. En otras plantas, como el trigo, el maíz, las alubias y la mandioca, también están siendo modificadas para mejorar su valor nutritivo, incrementando su contenido en vitaminas y minerales.

La ganadería lanar y vacuna ha sido clonada comercialmente durante más de 25 años, principalmente por el método de escisión del embrión. Este método se utiliza para producir dos animales de primera en lugar de uno. En 1996 se clonó la oveja Dolly (Figura 1.16) por un método nuevo, transfiriendo el núcleo de una célula adulta diferenciada a un óvulo enucleado. Este método de transferencia nuclear hace posible la producción de cientos o incluso miles de descendientes con los caracteres deseados. La clonación mediante transferencia del núcleo tiene muchas aplicaciones en la agricultura, el deporte y la medicina. Algunos caracteres deseables, como la elevada producción de leche o la velocidad de los caballos de carreras, no aparecen hasta el estado adulto; ahora se pueden clonar los animales con estos caracteres utilizando células diferenciadas. En aplicaciones médicas, los investigadores han transferido genes humanos a los animales, por lo que cuando son adultos producen proteínas humanas en su leche. Mediante la selección y clonación de animales con elevados niveles de producción de proteínas humanas, las compañías biofarmaceuticas pueden producir un rebaño con una tasa alta y uniforme de producción de proteínas. Las proteínas humanas se utilizan como medicamentos y ahora se están comprobando proteínas de animales



ALGUNOS CARACTERES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN PLANTAS CULTIVADAS

Resistencia a herbicidas
Maíz, Soja, Arroz, Algodón, Remolacha, Canola[1]
Resistencia a insectos
Maíz, Algodón, Patata
Resistencia a virus
Patata, Calabaza amarilla, Papaya
Contenido alterado en aceite
Soja, Canola
Maduración retrasada
Tomate

[1] *Nota del traductor:* Canola es el nombre comercial de una variedad de *Brassica napus*.



FIGURA 1.16 Dolly, una oveja Finn Dorset clonada de material genético de una célula mamaria adulta. Junto a ella Bonnie, su primer corderito.

transgénicos como tratamiento de enfermedades, como el enfisema. Si tiene éxito, estas proteínas estarán disponibles comercialmente muy pronto.

¿A quién pertenecen los organismos transgénicos?

Una vez obtenidos, ¿se pueden patentar los animales y vegetales transgénicos? La respuesta es sí. La Corte Suprema de los Estados Unidos decidió en 1980 que se pueden patentar los organismos vivos y el primer organismo modificado mediante la tecnología del DNA recombinante se patentó en 1988 (Figura 1.17). Desde entonces, se han patentado docenas de vegetales y animales. La ética de patentar organismos vivos es un tema controvertido. Los que apoyan patentarlos arguyen que sin la posibilidad de patentar los productos de investigación para recuperar su coste, las compañías de biotecnología no invertirían en investigación y desarrollo a gran escala. Además arguyen que las patentes son un incentivo para desarrollar nuevos productos, ya que las compañías obtendrán los beneficios de haberse arriesgado a conseguir nuevos productos para el mercado. Los críticos arguyen que patentar organismos, como plantas cultivadas, concentrará la propiedad de la producción de alimentos en manos de un pequeño número de compañías biotecnológicas, haciendo a los agricultores dependientes económicamente de las semillas y pesticidas producidas por estas compañías y reduciendo la diversidad genética de las plantas cultivadas, ya que los agricultores descartarán las variedades locales, que podrían albergar genes importantes para la resistencia a las plagas y a las enfermedades. Para resolver este y otros temas en relación con la biotecnología y su utilización, se necesita una combinación de concienciación pública, educación, política social liberal y legislación.



FIGURA 1.17 El primer organismo modificado por ingeniería genética que se patentó, ratones de la cepa *onc*, susceptible a muchos tipos de cánceres. Estos ratones se diseñaron para estudiar el desarrollo del cáncer y para diseñar nuevos fármacos anticancerígenos.

Biotecnología en genética y medicina

La biotecnología, en forma de pruebas genéticas y terapia génica, ya es una parte importante de la medicina. Esta tecnología figurará en la práctica médica del siglo XXI. La importancia de desarrollar pruebas y tratamientos para las enfermedades genéticas se subraya por la estimación de que más de 10 millones de niños y adultos de los Estados Unidos sufrirán alguna forma de dolencia genética y que cada pareja que espera un hijo tiene aproximadamente un riesgo del 3 por ciento de tenerlo con alguna forma de anomalía genética. Se conocen ahora las bases moleculares de cientos de dolencias genéticas (Figura 1.18). Por ejemplo, se han clonado los genes para la anemia falciforme, fibrosis quística, hemofilia, distrofia muscular, fenilcetonuria y muchos otros trastornos genéticos. Estos genes clonados se utilizan para la detección prenatal de fetos afectados. Además, los padres también pueden conocer su estatus de «portadores» para un gran número de trastornos genéticos. La combinación de las pruebas genéticas y el consejo genético da a las parejas información objetiva sobre la decisión que pueden tomar acerca del embarazo. En la actualidad se dispone de pruebas genéticas para cientos de enfermedades genéticas hereditarias, y este número crecerá cuando se identifiquen, se aíslen y se clonen más genes. El uso de las pruebas genéticas y de otras tecnologías, incluida la terapia génica, ha planteado problemas éticos que todavía se tienen que resolver.

En lugar de comprobar un gen cada vez para descubrir si alguien tiene un gen mutante que puede afectar a sus hijos, se están desarrollando tecnologías que permitirán explorar el genoma de un individuo para determinar el riesgo personal de desarrollar una dolencia genética o de tener un hijo afectado. Esta tecnología utiliza un aparato llamado **microseries de DNA** o

• Prueba de DNA normalmente disponible

Adrenoleucodistrofia (ALD) •
Enfermedad mortal del sistema nervioso

Distrofia muscular •
Deterioro progresivo de los músculos

Azoospermia

Enfermedad de Gaucher •
Deficiencia enzimática crónica que se encuentra frecuentemente entre los judíos Ashkenazi

Hemofilia A •
Deficiencia en la coagulación

Síndrome de Ehlers-Danlos
Enfermedad del tejido conjuntivo

Síndrome de mala absorción de glucosa-galactosa •
Trastorno digestivo potencialmente letal

Retinosis pigmentaria •
Degeneración progresiva de la retina

Esclerosis lateral amiotrófica (ALS) •
Enfermedad nerviosa degenerativa de aparición tardía y letal

Enfermedad de Huntington •
Enfermedad degenerativa del sistema nervioso, de aparición tardía y letal

Deficiencia inmune ADA •
Primer trastorno hereditario tratado con terapia génica

Poliposis adenomatosa familiar (FAP) •
Pólipos intestinales que degeneran en cáncer de colon

Hipercolesterolemia familiar •
Colesterol extremadamente elevado

Hemocromatosis •
Absorción anormalmente elevada de hierro de la dieta

Distrofia miotónica •
Forma de distrofia muscular en adultos

Ataxia espinocerebelar •
Destrucción de nervios del cerebro y de la espina dorsal, dando lugar a la pérdida del control muscular

Amiloidosis •
Acumulación en los tejidos de una proteína fibrilar insoluble

Número de cromosomas humanos

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 X Y

Fibrosis quística •
Mucosidad en los pulmones que interfiere con la respiración

Neurofibromatosis (NF1) •
Tumores benignos del tejido nervioso debajo de la piel

Síndrome de Werner •
Envejecimiento prematuro

Cáncer de mama •
El 5% de todos los casos

Melanoma •
Tumores que se originan en la piel

Enfermedad poliquística del riñon •
Quistes que dan lugar a riñones dilatados y fallos renales

Neoplasia endocrina múltiple, Tipo 2 •
Tumores en glándulas endocrinas y otros tejidos

Enfermedad de Tay-Sachs •
Trastorno hereditario mortal que implica al metabolismo de los lípidos, que se presenta a menudo en judíos Ashkenazi

Anemia falciforme •
Anemia hereditaria crónica, en la que los glóbulos rojos adquieren forma de hoz, obstruyendo arteriolas y capilares

Enfermedad de Alzheimer
Trastorno degenerativo del cerebro marcado por senilidad prematura

Fenilcetonuria (PKU) •
Error congénito del metabolismo; si no se trata resulta en retraso mental

Retinoblastoma •
Tumor juvenil en los ojos

FIGURA 1.18 Esquema de la dotación de cromosomas humanos, mostrando la localización de algunos genes cuyas formas mutantes dan lugar a enfermedades hereditarias. Las situaciones que se pueden diagnosticar utilizando análisis de DNA se indican con un punto rojo.

chips de DNA (Figura 1.19). Cada «chip» contiene miles de campos, cada uno con un gen distinto. De hecho, los «chips» que llevan el genoma humano están disponibles comercialmente, siendo posible examinar el genoma completo de cualquiera para comprobar qué enfermedades genéticas lleva el individuo o puede desarrollar. La tecnología de «chips» de DNA tiene también otras muchas aplicaciones, como comprobar la expresión génica en células cancerosas para desarrollar terapias diseñadas para formas específicas de cáncer.

Además de comprobar las anomalías genéticas, los clínicos pueden transferir genes normales a individuos afectados con enfermedades genéticas mediante un procedimiento conocido como **terapia génica**. Aunque inicialmente tuvo éxito, fallos terapéuticos y la muerte de pacientes han retardado su desarrollo. Avances recientes en métodos de transferencia génica pueden reducir los riesgos implicados y parece cierto que la terapia génica se convertirá en una herramienta importante para

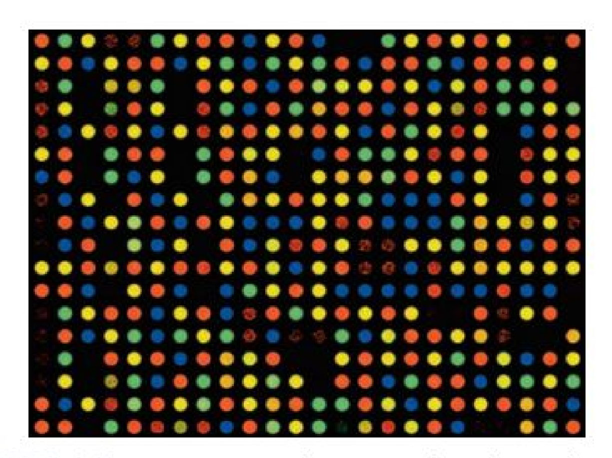


FIGURA 1.19 Una microserie de DNA. La placa de cristal contiene miles de campos a los que se unen moléculas de DNA. Utilizando esta microserie, se puede comprobar el DNA de un individuo para detectar copias mutantes de genes.

tratar anomalías hereditarias. De hecho, cuanto mas sabemos acerca de las bases moleculares de las enfermedades humanas, mas terapias se pueden desarrollar. Gran parte de la investigación actual sobre enfermedades genéticas humanas se basa en la utilización de organismos modelo.

1.5 Los estudios genéticos confían en la utilización de organismos modelo

Después del redescubrimiento del trabajo de Mendel en 1900, la investigación genética en un gran número de organismos confirmó que los principios de la herencia que él describió eran de aplicación universal para animales y vegetales. Aunque se continuó trabajando sobre la genética de muchos organismos distintos, gradualmente los genéticos centraron su atención en un pequeño número de ellos, como *Drosophila*, el ratón (*Mus musculus*) y el maíz (*Zea mays*) (Figura 1.20). Estos organismos fueron populares principalmente por dos razones: primero, estaba claro que los mecanismos genéticos eran los mismos en la mayoría de los organismos, y segundo, estas especies tenían varias ventajas para la investigación genética. Eran fáciles de reproducir, tenían ciclos biológicos relativamente cortos, daban lugar a muchos descendientes y el análisis genético era bastante directo. Con el tiempo, los investigadores crearon un amplio catálogo de cepas mutantes de cada especie. Estas mutaciones se estudiaron cuidadosamente, se caracterizaron y se cartografiaron. Debido a su genética muy bien desarrollada, estas especies se convirtieron en **organismos modelo**, que definimos como organismos utilizados para el estudio de procesos biológicos básicos, como los procesos celulares normales así como también trastornos genéticos y otras enfermedades. Los organismos modelo, como veremos en capítulos posteriores, se usan para estudiar muchos aspectos de la biología, como el envejecimiento, el cáncer, el sistema inmunológico y el comportamiento.

La serie actual de organismos modelo en genética

Gradualmente, otras especies también se han convertido en organismos modelo para la investigación en genética y en biología moderna. Hacia mediados del siglo XX, los virus (como los fagos T y el fago lambda) y los microorganismos (como la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Neurospora crassa*) se han utilizado como modelos (Figura 1.21). Algunos de estos se eligieron por las razones indicadas mas arriba, mientras que otros se seleccionaron porque permitían estudiar mas fácilmente sobre ciertos aspectos genéticos.

En la última parte del siglo, se seleccionaron y desarrollaron como organismos modelo tres nuevos organismos. Cada uno comenzó como un sistema utilizado para estudiar algunos aspectos del desarrollo embrionario. Para estudiar el sistema nervioso y su papel en el comportamiento se eligió como sistema modelo al nemátodo *Caenorhabditis elegans* [Figura 1.22(a)]. Es pequeño, fácil de cultivar, tiene un sistema nervioso son sólo unos cientos de células y tiene un programa invariable de especificación celular durante el desarrollo. *Arabidopsis thaliana* [Figura 1.22(b)] es una pequeña planta, con un ciclo biológico corto, que puede cultivarse en el laboratorio. Se utilizó primero para estudiar el desarrollo de la flor, pero ha llegado a ser un organismo modelo para el estudio de muchos otros aspectos de biología vegetal. El pez cebra, *Danio rerio*, [Figura 1.22(c)] tiene varias ventajas para el estudio del desarrollo de los vertebrados; es pequeño, se reproduce rápida-

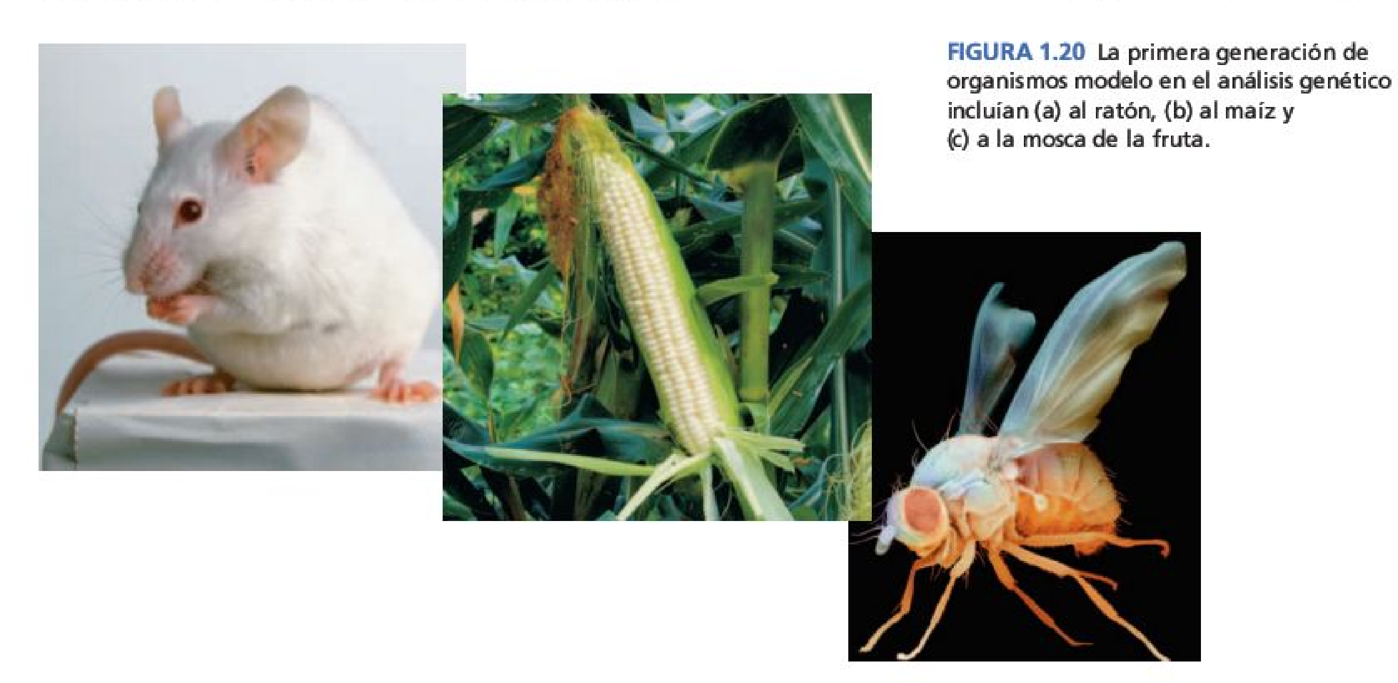


FIGURA 1.20 La primera generación de organismos modelo en el análisis genético incluían (a) al ratón, (b) al maíz y (c) a la mosca de la fruta.

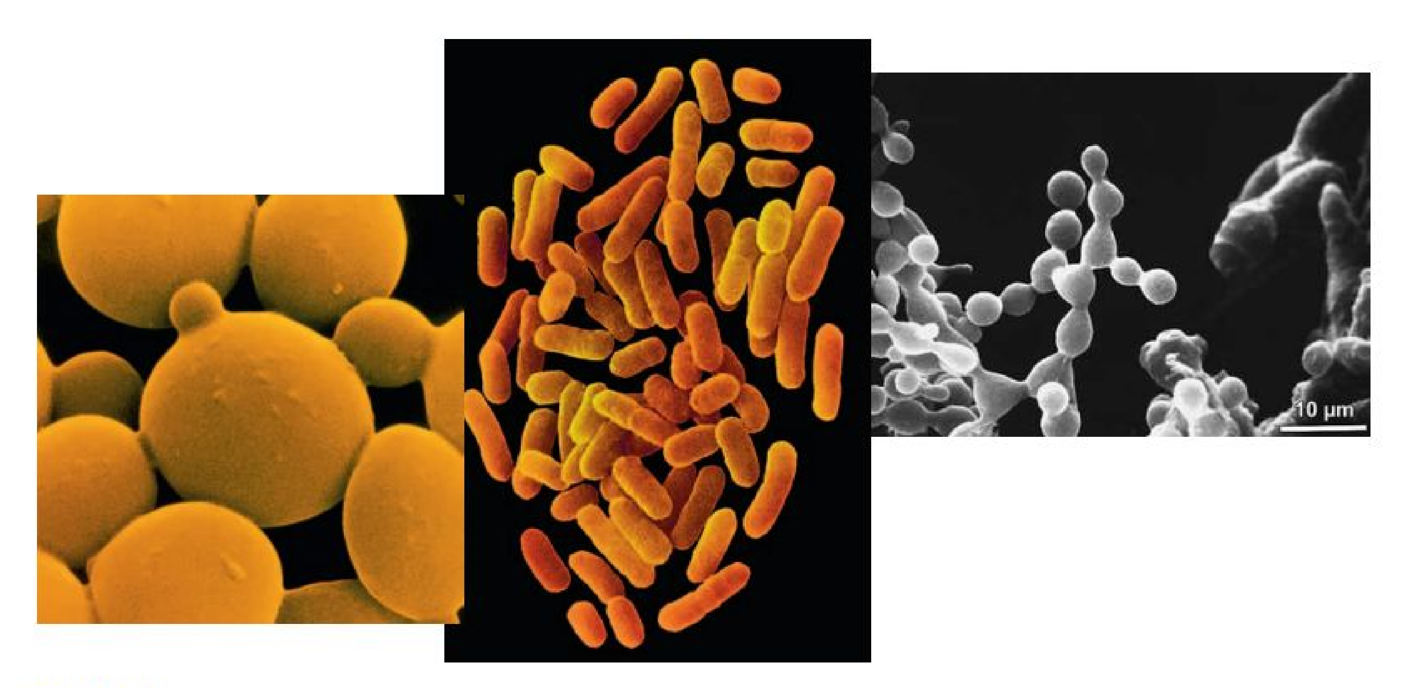


FIGURA 1.21 Entre los microorganismos que se han convertido en organismos modelo para estudios genéticos se encuentran (a) la levadura *Saccharomyces*, (b) la bacteria *E. coli* y (c) el hongo *Neurospora*.

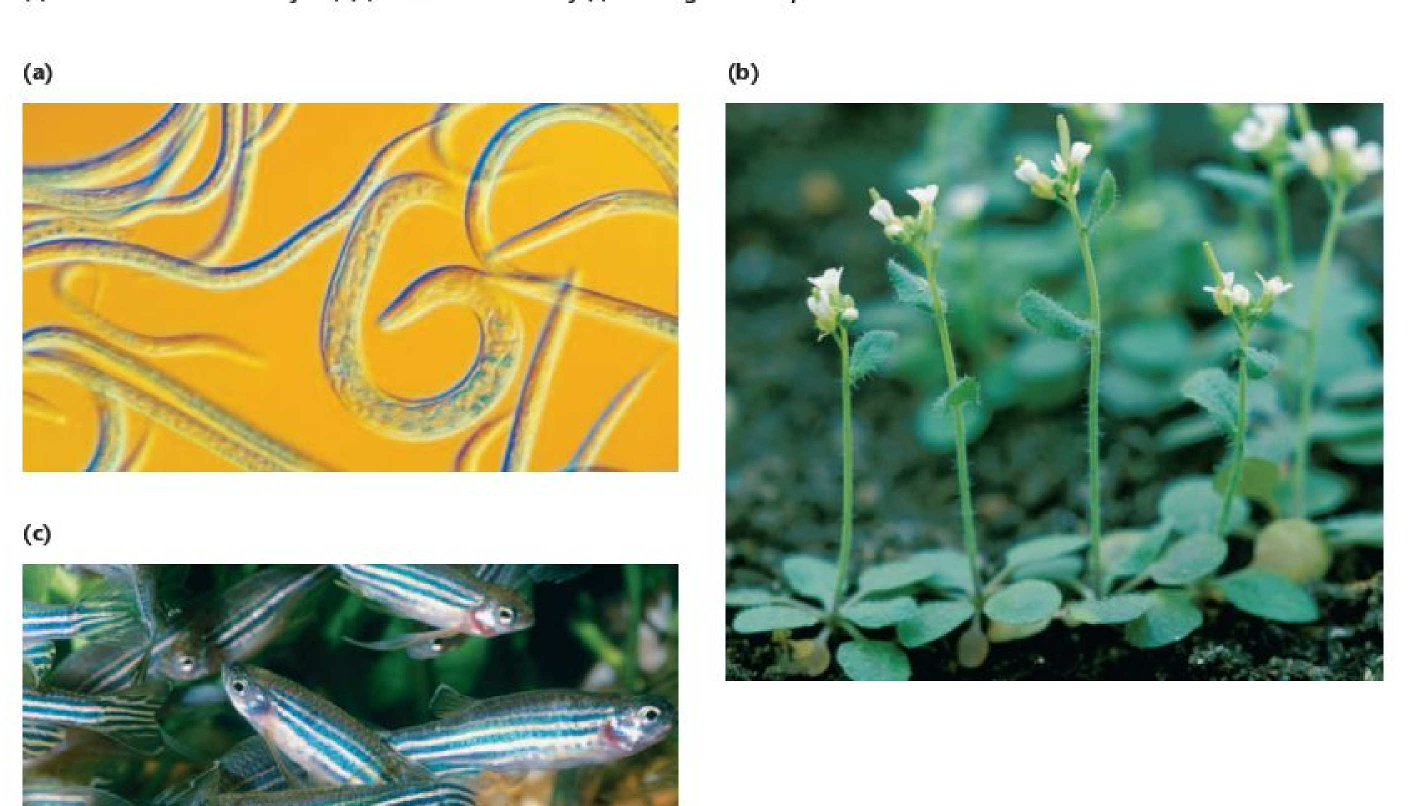


FIGURA 1.22 La tercera generación de organismos modelo en genética incluyen (a) al nemátodo *C. elegans*, (b) a la planta *Arabidopsis* y (c) al pez cebra.

mente y el huevo, el embrión y las larvas son transparentes. En cada una de estas especies, los genéticos reunieron gran número de mutantes, haciendo que estos organismos sean modelos útiles para el estudio, no sólo del desarrollo, sino también de una gran variedad de otros procesos biológicos en biología animal y vegetal.

Algunos de los primeros organismos modelo se utilizan ahora para estudiar unos pocos problemas, o han sido reemplazados por otros organismos modelo. *Neurospora*, que una vez fue un organismo básico en genética, ha sido desplazado por la levadura y ahora se utiliza principalmente para investigar sobre temas especializados, como los ritmos circadianos. El maíz ha sido reemplazado en gran parte por *Arabidopsis* como organismo modelo para el estudio de las fanerógamas.

Organismos modelo y enfermedades humanas

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y los resultados de los proyectos de secuenciación de los genomas, han confirmado que la vida tiene un origen común, y por ello, los genes con funciones similares en distintos organismos tienen una estructura y secuencia del DNA similar o idéntica. Además, la capacidad de transferir genes entre especies ha hecho posible desarrollar modelos de enfermedades humanas en organismos como las bacterias, hongos, vegetales y animales (Tabla 1.2). Por estas razones, el Proyecto Genoma Humano incorporó proyectos para secuenciar los genomas de cinco organismos modelo, además del genoma humano. Otros proyectos genoma han secuenciado los genomas de los restantes organismos modelo, así como los genomas de cientos de organismos.

Puede parecer extraño estudiar una enfermedad humana, como el cáncer de colon, utilizando *E. coli*, pero los procesos básicos de reparación del DNA (el DNA es defectuoso en algunas formas de cáncer de colon) es el mismo en ambos organismos, y el gen implicado (*mutL* en *E. coli* y *MLH1* en humanos) es el mismo en ambos organismos. Aun más importante, *E. coli* tiene la ventaja de ser más fácil de cultivar (las células se dividen cada 20 minutos) y es más fácil de producir y estudiar mutaciones nuevas en el gen *mutL* para ayudar a comprender como funciona. Este conocimiento puede conducir finalmente al desarrollo de fármacos y otras terapias para tratar el cáncer de colon humano.

TABLA 1.2 ORGANISMOS MODELO PARA ESTUDIAR ENFERMEDADES HUMANAS

Organismo	Enfermedades humanas
E. coli	Reparación del DNA; cáncer de colon y otros cánceres
Levadura	Ciclo celular; cáncer, Síndrome de Werner
Drosophila	Marcaje celular; cáncer
C. elegans	Marcaje celular; diabetes
Pez cebra	Rutas de desarrollo; enfermedad cardiovascular
Ratón	Expresión génica; enfermedad de Lesch-Nyhan, fibrosis quística, síndrome del X frágil y muchas otras enfermedades

Otros organismos modelo, como la mosca *Drosophila melanogaster*, se están utilizando para estudiar enfermedades humanas concretas. Durante varias décadas se han identificado en *Drosophila* muchos genes mutantes que producen fenotipos con anormalidades en el sistema nervioso, como anormalidades en la estructura del cerebro, aparición en la edad adulta de la degeneración del sistema nervioso y defectos visuales como la degeneración de la retina. La información de los proyectos de secuenciación de genomas indica que casi todos los genes tienen equivalentes en humanos. Como ejemplo, los genes implicados en una enfermedad humana compleja de la retina, llamada retinosis pigmentaria, son idénticos a los genes *rdgB* y *rdgC* de la degeneración de la retina en *Drosophila*. El estudio de estas mutaciones en *Drosophila* ayuda a la disección de esta enfermedad compleja y a identificar la función de los genes implicados.

Utilizando la tecnología del DNA recombinante, se está usando *Drosophila* como modelo para estudiar enfermedades del sistema nervioso humano, transfiriendo un gen de la enfermedad humana a las moscas. De este modo, es posible crear modelos para enfermedades humanas concretas. Las moscas que llevan genes humanos se utilizan para estudiar los efectos de estos genes mutantes sobre el desarrollo y función del sistema nervioso y de sus componentes. Además de estudiar al mismo gen mutante, el sistema modelo se puede utilizar para estudiar genes que afectan a la expresión de genes de enfermedades humanas y comprobar los efectos de fármacos terapéuticos sobre la acción de estos genes, estudios que son difíciles o imposibles de hacer en los humanos. Este planteamiento de transferir genes a *Drosophila* se está utilizando para estudiar casi una docena de anomalías neurodegenerativas humanas, como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Machado-Joseph, la distrofia miotónica y el Alzheimer.

A medida que lea el texto, encontrará estos organismos modelo una y otra vez en el análisis genético de procesos biológicos básicos. Recuerde, que no solo tienen una rica historia en genética, sino que también son la frontera en el estudio de anomalías genéticas humanas y enfermedades infecciosas. Recuerde que la comprensión de cómo un gen controla un proceso en la levadura es relevante para la comprensión del mismo gen y del mismo proceso en células normales humanas.

El desarrollo y utilización de organismos modelo es solo una de las formas genéticas y biotecnológicas que están cambiando rápidamente muchos aspectos de la vida diaria. Como se discute en la sección siguiente, todavía tenemos que alcanzar un consenso en cómo y cuándo esta tecnología es aceptable y útil.

1.6 Vivimos en la «Era de la Genética»

La genética ya no es sólo una ciencia de laboratorio, en donde los investigadores estudian la mosca de la fruta o la levadura para aprender acerca de los procesos básicos de la función o el desarrollo de la célula. Como indicamos al principio de este capítulo, es el corazón de la biología y el método elegido para diseccionar y entender las funciones y disfunciones de los sistemas biológicos. A medida que los conocimientos han aumentado, la genética se ha implicado en muchos temas sociales. La genética y sus aplicaciones en forma de biotecnología se están desarrollando ahora mas rápido que las convenciones sociales, la política y las leyes. Aunque otras disciplinas científicas también están ampliando el conocimiento, ninguna tiene paralelismos con el crecimiento de la información que se está dando en la genética. Aunque nunca ha habido un tiempo mas interesante para estar inmerso en el estudio de la genética, el impacto potencial de esta disciplina en la sociedad nunca ha sido tan profundo. Estamos seguros de que al final de este curso estará de acuerdo en que la presente es realmente la «Era de la Genética,» y le animamos a pensar en ello y a participar en el diálogo acerca de la genética y de sus aplicaciones en la sociedad.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Cuando se introduzca en el estudio de la Genética, queremos que sea consciente de un aspecto especial de este texto que se encuentra al final de muchos capítulos: los ensayos sobre **Genética, Tecnología y Sociedad**. En estos ensayos cubrimos una serie de temas derivados de la genética que impactan en la vida de cada uno de nosotros y por ello en la sociedad en general. La genética afecta a todos los aspectos de la vida moderna. Las tecnologías genéticas cambian rápidamente de qué manera enfocamos la medicina, la agricultura, la legislación, la industria farmacéutica y biotecnológica. Ahora utilizamos cientos de pruebas genéticas para diagnosticar y predecir el curso de la enfermedad y para detectar defectos genéticos *in utero*. Los métodos basados en el DNA permiten a los científicos trazar el camino evolutivo que han seguido muchas especies, incluyendo la nuestra. Ahora diseñamos cultivos resistentes a las enfermedades y a la sequía, así como animales de granja mas productivos, utilizando técnicas de transferencia génica. Aplicamos métodos de DNA para comprobar la paternidad o investigar los asesinatos. Las bases biotecnológicas sobre la información de la investigación genómica ha tenido efectos dramáticos sobre la industria. La industria biotecnológica se duplica en cada década, generando unos 700.000 puestos de trabajo y 50.000 millones de dólares en ingresos cada año.

Junto con estos rápidos cambios basados en tecnologías genéticas, se plantean una serie de desafíos y dilemas éticos. ¿A quién pertenece y quien controla la información genética? Los vegetales y animales mejorados genéticamente, ¿son seguros para la humanidad y para el ambiente? ¿Tenemos derecho a patentar organismos y aprovecharnos de su comercialización? ¿Cómo podemos asegurar que la tecnología genética estará disponible para todos y no solo para los ricos? ¿Cuáles son los temas sociales que acompañan a las nuevas tecnologías de la reproducción? Es el momento en que cada uno necesita entender genética a fin de hacer elecciones personales y sociales complejas.

El objetivo de los ensayos sobre **Genética, Tecnología y Sociedad** es introducir temas que interaccionan con la sociedad, incluyendo algunas de las nuevas tecnologías basadas en genética y genómica. También exploraremos los aspectos sociales y éticos relevantes. Es nuestro deseo que estos ensayos actúen como puntos de entrada para la exploración de las muchas aplicaciones e implicaciones sociales de la genética actual. Mas abajo damos la lista de los temas que servirán de base de muchos de estos ensayos (incluyendo los capítulos en donde se encuentran). Aun cuando su curso de Genética no cubra todos los capítulos, esperamos que encuentre interesantes los ensayos en dichos capítulos. Buena lectura!

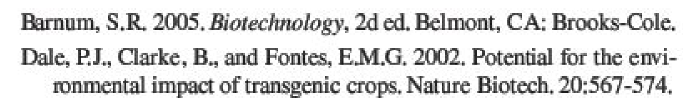
RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. El trabajo de Mendel con la planta de guisante estableció los principios de la transmisión de los genes de padres a hijos y los fundamentos de la Genética.
2. Los genes y los cromosomas son las unidades fundamentales de la teoría cromosómica de la herencia, que explica la transmisión de la información genética que controla los caracteres fenotípicos.
3. La genética molecular, basada en el dogma central de que el DNA fabrica RNA –el cual fabrica proteínas- sirve de sostén a la genética mendeliana, que se denomina genética de la transmisión.
4. La tecnología del DNA recombinante permite que genes de un organismo sean unidos a vectores y se clonen, sirviendo de base para una tecnología de gran alcance utilizada en genética molecular.
5. La genómica es una aplicación de la tecnología del DNA recombinante mediante la que se secuencia el contenido genético completo de un organismo y se explora la estructura y función de sus genes. El Proyecto Genoma Humano es un ejemplo de genómica.
6. La biotecnología ha revolucionado la agricultura, la industria farmacéutica y la medicina. Ha hecho posible la producción en masa de productos génicos importantes para la medicina. Las pruebas genéticas y la terapia génica permiten la detección de individuos con anomalías genéticas y de aquellos con riesgo de tener hijos afectados.
7. El uso de organismos modelo en genética ha desarrollado nuestros conocimientos básicos sobre los mecanismos genéticos y, unido a la tecnología del DNA recombinante, se ha utilizado para desarrollar modelos de enfermedades genéticas humanas.
8. La tecnología genética está afectando a muchos aspectos de la sociedad. El desarrollo de políticas y legislación se está quedando atrás respecto de las innovaciones y usos de la biotecnología.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Describa las conclusiones de Mendel acerca de cómo los caracteres pasan de generación en generación.
2. ¿Cuál es la teoría cromosómica de la herencia y como está relacionada con los descubrimientos de Mendel?
3. Defina genotipo y fenotipo e indique como están relacionados.
4. ¿Qué son los alelos? Si un individuo lleva genes a pares ¿es posible que existan más de dos alelos por gen?
5. Dado el estado del conocimiento en aquel momento, ¿por qué fue difícil para algunos científicos aceptar que el DNA era el portador de la información genética?.
6. Compare cromosomas y genes.
7. ¿Cómo está codificada la información genética en una molécula de DNA?
8. Describa el dogma central de la genética molecular y como sirve de base para la genética moderna.
9. ¿Cuántas proteínas diferentes son posibles, cada una con una secuencia de aminoácidos única, en una proteína con cinco aminoácidos?
10. Resuma el papel jugado por las enzimas de restricción y por los vectores en la clonación del DNA.
11. ¿Qué impacto ha tenido la biotecnología en las plantas cultivadas en los Estados Unidos?
12. Resuma los argumentos a favor y en contra para patentar los organismos modificados genéticamente.
13. En nuestro genoma llevamos de 25.000 a 30.000 genes. Hasta el momento, se han derivado patentes de más de 6.000 de estos genes. ¿Cree que las empresas o los individuos pueden patentar genes humanos? ¿Por qué si o por qué no?
14. ¿Cómo ha avanzado nuestro conocimiento de los genes que controlan enfermedades humanos con el uso de organismos modelo?
15. Si supiera de una enfermedad hereditaria de efectos desastrosos y aparición tardía en su familia y pudiera comprobarla en usted mismo a la edad de 20 años, ¿desearía saber si es portador? ¿Cambiaría probablemente su respuesta cuando tuviera 40 años?

LECTURAS SELECCIONADAS



Barnum, S.R. 2005. *Biotechnology*, 2d ed. Belmont, CA: Brooks-Cole.

Dale, P.J., Clarke, B., and Fontes, E.M.G. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. Nature Biotech. 20:567-574.

Fortini, M. and Bonini, N.M. 2000. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila. Trends Genet.* 16:161-167.

Lurquin, P. 2002. *High Tech Harvest*. Boulder, CO: Westview Press.

Potter, C.J., Turenchalk, G.S., and Xu, T. 2000. *Drosophila* in cancer research: An expanding role. *Trends Genet.* 16:33–39.

Pray, C.E., Huang, J., Hu, R., and Rozelle, S. 2002. Five years of Bt cotton in China—The benefits continue. *The Plant Journal* 31:423-430.

Primrose, S.B., and Twyman, R.M. 2004. *Genomics: Applications in Human Biology.* Oxford, Blackwell Publishing.

Weinberg, R.A. 1985. The molecules of life. *Sci. Am.* (Oct.) 253:48-57.

Wisniewski, J-P., Frange, N., Massonneau, A., and Dumas, C. 2002. Between myth and reality: Genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie* 84:1095-1103.

Yang, X., Tian, X.C., Dai, Y., and Wang, B. 2000. Transgenic farm animals: Applications in agriculture and biomedicine. *Biotechnol. Annu. Rev.* 5:269-292.

Mitosis y meiosis



Cromosomas en el estadio de prometafase de la mitosis, de una célula de la flor de Haemanthus.

Conceptos del capítulo

- La continuidad genética entre las células y entre los organismos de cualquier especie con reproducción sexual se mantiene gracias a la mitosis y la meiosis, respectivamente.
- Las células eucariotas diploides tienen su información genética en pares de cromosomas homólogos, derivándose cada miembro de cada pareja, uno del padre y otro de la madre.
- La mitosis proporciona un mecanismo para distribuir los cromosomas que se han duplicado a las células hijas en la reproducción celular.
- La mitosis da lugar a que una célula somática diploide se convierta en dos células hijas diploides.
- La meiosis distribuye cada uno de los cromosomas homólogos a un gameto o espora, reduciendo así el número de cromosomas diploide a un número de cromosomas haploide.
- La meiosis da lugar a variabilidad genética al distribuir hacia los gametos o esporas distintas combinaciones de cromosomas paternos y maternos de cada pareja de cromosomas homólogos.
- Precisamente en las fases de la mitosis y de la meiois es cuando el material genético se condensa, formando estructuras discretas llamadas cromosomas.
- Los vegetales tienen alternancia de un estadio de esporófito diploide a otro de gametofito haploide.

En cada ser vivo hay una sustancia que se denomina el material genético. Excepto en ciertos virus, este material esta compuesto del ácido nucleico DNA. Una molécula de DNA tiene muchas unidades llamadas genes, cuyos productos dirigen todas las actividades metabólicas de las células. El DNA, con su batería de genes, está organizado en cromosomas, estructuras que sirven de vehículo para la transmisión de la información genética. El modo en el que los cromosomas se transmiten de una generación celular a la siguiente, y de los organismos a sus descendientes, tiene que ser extraordinariamente preciso. En este capítulo consideraremos cuán exactamente se mantiene la continuidad genética entre células y organismos.

En los eucariotas hay dos procesos muy importantes: la **mitosis** y la **meiosis**. Aunque el mecanismo de ambos procesos es similar en muchos aspectos, los resultados son totalmente diferentes. La mitosis conduce a la producción de dos células, cada una de ellas con un número de cromosomas idéntico al de la célula paterna. Por el contrario, la meiosis reduce la cantidad de material genético y el número de cromosomas exactamente a la mitad. Esta reducción es esencial a fin de que se dé la reproducción sexual sin duplicar la cantidad de material genético en cada generación. Concretamente, la mitosis es aquel periodo del ciclo celular durante el cual los cromosomas duplicados se reparten de manera precisa e igual en las células hijas. La meiosis es parte de un tipo especial de división celular que da lugar a la producción de células sexuales: los **gametos** o las **esporas**. Este proceso es un paso esencial en la transmisión de la información genética de un organismo a sus descendientes.

Normalmente, los cromosomas son visibles durante el ciclo celular sólo en la mitosis o en la meiosis. Cuando las células no están dividiéndose, el material genético que constituye los cromosomas se despliega y desespiraliza, dando lugar en el interior del núcleo a una red difusa, que en general se denomina cromatina. Revisaremos brevemente la estructura de las células, haciendo hincapié en los componentes que tienen un significado particular para la función genética. Posteriormente, dedicaremos el resto del capítulo al comportamiento de los cromosomas durante la división celular.

2.1 La estructura de la célula está íntimamente ligada con la función génica

Antes de describir la mitosis y la meiosis, será útil revisar brevemente la estructura de las células. Veremos que muchos componentes celulares, como los nucleolos, ribosomas y centriolos, tienen que ver, directa o indirectamente, con procesos genéticos. Otros componentes, como las mitocondrias o los cloroplastos, tienen sus propias unidades genéticas de información. También es útil comparar las diferencias estructurales entre las células bacterianas procariotas y las células eucariotas. La variación en la estructura y en la función de las células depende de la expresión génica específica para cada tipo celular.

El conocimiento de la estructura celular se limitaba, antes de 1940, a la información obtenida con el microscopio óptico. En la década de los 40, el microscopio electrónico se encontraba en sus primeras fases de desarrollo y ya hacia 1950 se pudieron desvelar muchos detalles ultraestructurales de la célula. Con el microscopio electrónico se vio que las células eran estructuras particulares y altamente organizadas. Apareció un nuevo mundo de membranas retorcidas, orgánulos, microtúbulos, gránulos y filamentos. Estos revolucionarios descubrimientos invadieron todo el campo de la Biología. Nos ocuparemos de aquellos aspectos de la estructura celular relacionados con el estudio genético. En la Figura 2.1 se representa a una célula animal típica, con muchas de las estructuras que se discutirán.

Límites celulares

Todas las células están rodeadas por una **membrana plasmática**, que es una cubierta externa que define los límites celulares y delimita a la célula respecto de su ambiente externo inmediato. No es una membrana pasiva, sino que regula activamente el paso de sustancias, desde el exterior y hacia el exterior de la célula. Además de esta membrana, las células vegetales tienen una cubierta externa llamada **pared celular**. Uno de los componentes principales de esta estructura rígida es un polisacárido denominado **celulosa**.

Las bacterias tienen también una pared celular, pero su composición química es completamente diferente de la composición de la pared celular vegetal siendo el componente principal una macromolécula compleja denominada **peptidoglucano**. Como sugiere su nombre, la molécula consta de péptidos y azúcares. Largas cadenas de polisacáridos permanecen unidas transversalmente por péptidos cortos, lo que confiere gran robustez y rigidez a la bacteria. Algunas bacterias todavía tienen otra cubierta, la **cápsula**. Este material mucoso protege a estas bacterias, en su invasión patogénica a organismos eucariotas, de la actividad fagocitaria del huésped. La presencia de la cápsula está regulada genéticamente. De hecho, como veremos en el Capítulo 9, su pérdida, debida a una mutación en la bacteria *Diplococcus pneumoniae*, responsable de la neumonía, sentó las bases para un importante experimento que confirmó que el DNA es el material genético.

Muchas de las células animales, si no la gran mayoría, tienen una cubierta por encima de la membrana plasmática, denominada **cubierta celular**. La composición química de la cubierta celular, formada por glicoproteínas y polisacáridos, difiere de estructuras comparables tanto en vegetales como en bacterias. Una de las funciones de la cubierta celular es dar identidad bioquímica a la superficie celular. Esta forma de identidad celular de la superficie celular se encuentra bajo el control genético. Por ejemplo, varios determinantes antigénicos, como

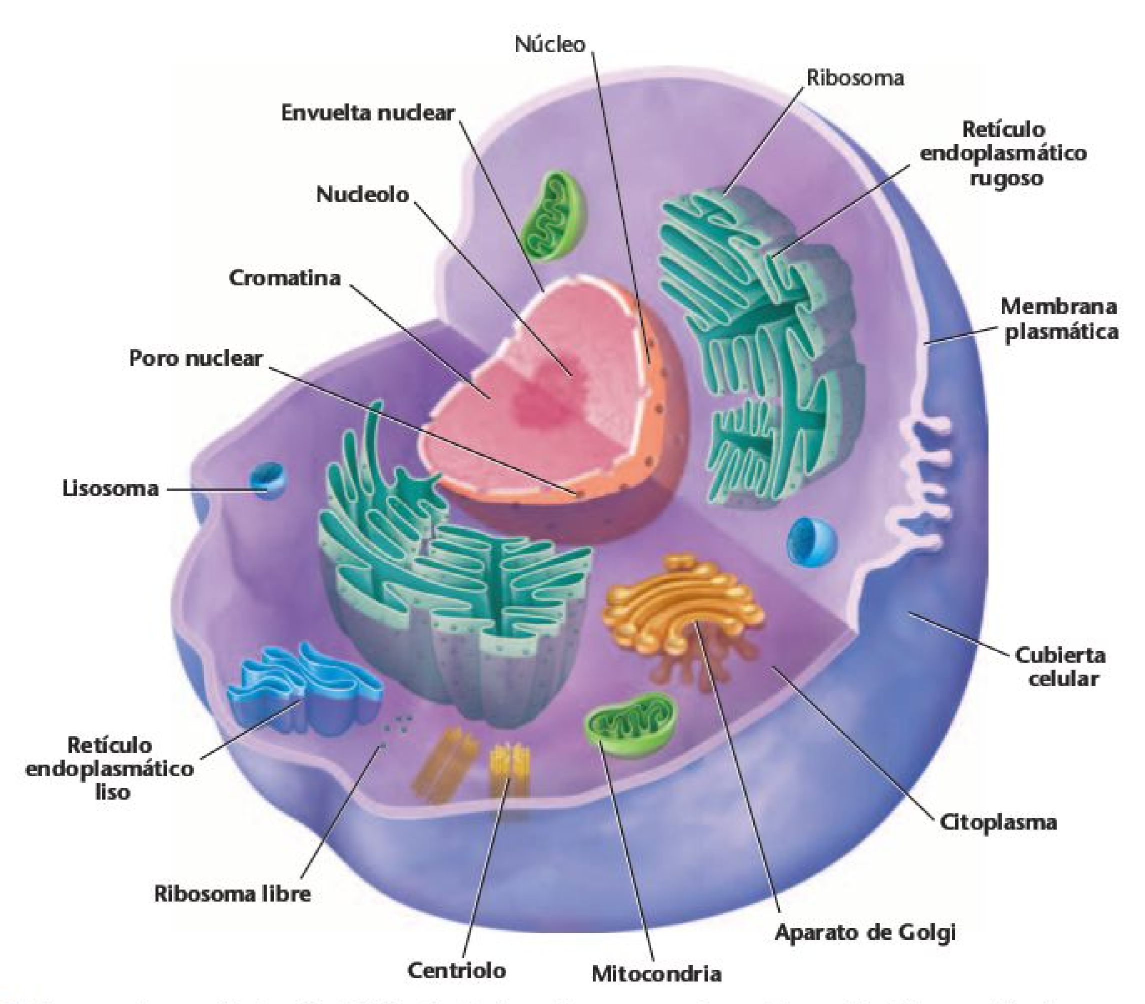


FIGURA 2.1 Esquema de una célula animal típica. Se destacan los componentes celulares discutidos en el texto.

los **antígenos AB** y **MN**[1], se encuentran en la superficie de los glóbulos rojos. En otras células se encuentran los **antígenos de la histoincompatibilidad,** que pueden inducir una respuesta inmune en los trasplantes de tejidos y órganos. Además, cierto número de **moléculas receptoras** son también componentes importantes de la superficie celular. Estas son lugares de reconocimiento que transfieren a la célula.

El núcleo

La presencia del núcleo y de otros orgánulos membranosos, es característico de las células eucariotas. El **núcleo** alberga al material genético, el DNA, asociado a un gran número de proteínas ácidas y básicas, formando fibras delgadas. En el periodo del ciclo celular en el que no hay división, estas fibras se encuentran dispersas y desespiralizadas formando la **cromatina**. Como discutiremos mas adelante, estas fibras de cromatina se espiralizan y se condensan en la mitosis y la meiosis, dando lugar a unas estructuras denominadas **cromosomas**. En el núcleo también se encuentra el **nucleolo**, un componente amorfo, en donde se sintetiza el RNA ribosómico y en donde ocurren las primeras fases del ensamblaje de los ribosomas. Las regiones del DNA que codifican al rRNA constituyen en conjunto la **región organizadora nucleolar,** o **NOR**.

La ausencia de cubierta nuclear y de orgánulos membranosos es característica de los procariotas. En la bacteria *Escherichia coli,* el material genético es una larga molécula circular de DNA, compactada en un área que se denomina **nucleoide**. Parte del DNA puede estar unido a la membrana celular, pero en general el nucleoide abarca una extensa área de la célula. Aunque el DNA está compactado, no sufre la espiralización característica de los estadios mitóticos de los eucariotas, que es cuando los cromosomas se hacen visibles. Tampoco el DNA de estos organismos está asociado tan ampliamente a proteínas como el DNA de los eucariotas. En la Figura 2.2 se muestra la formación de dos bacterias por división celular e ilus-

[1] *Nota del traductor:* No obstante, hay una diferencia básica entre los grupos sanguíneos AB0 y MN, y es que este último no tiene implicaciones clínicas debido a que no hay una reacción fuerte entre los antígenos de este grupo, por lo que no se tiene en cuenta en las transfusiones sanguíneas.

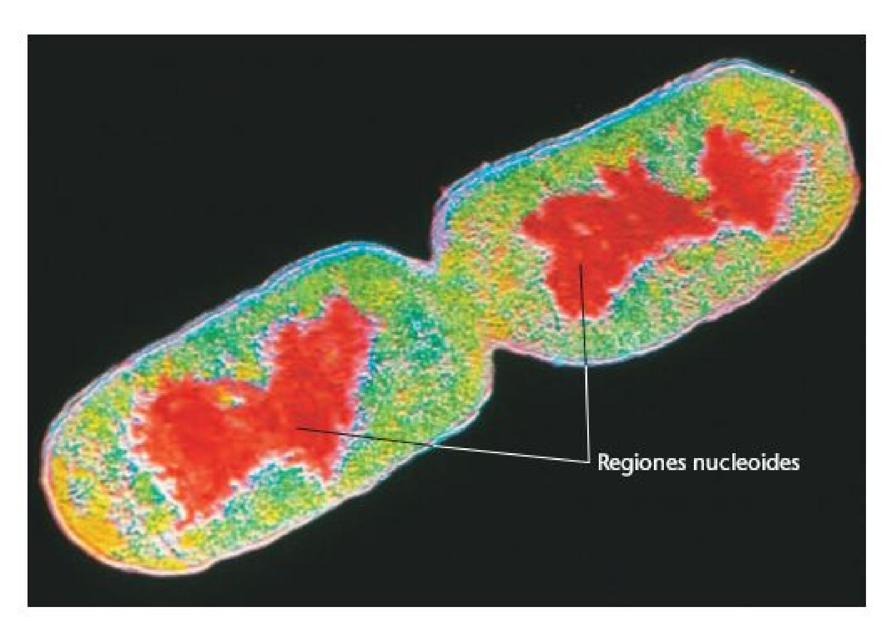


FIGURA 2.2 Micrografía electrónica con intensificación de color de *E. coli* en división celular. Hay dos áreas cromosómicas especialmente visibles (en rojo) llamadas nucleoides, resultado de la partición entre las dos células hijas.

tra los nucleoides que albergan a los cromosomas bacterianos. Las células procariotas no tienen nucleolo diferenciado, aunque tienen genes que codifican moléculas de rRNA.

El citoplasma y sus orgánulos

Excluyendo al núcleo, el resto de la célula eucariota que queda rodeada por la membrana plasmática está compuesto por el **citoplasma** y por todos los orgánulos celulares asociados. El citoplasma es una sustancia coloidal, sin partículas, denominada **citosol,** que rodea y engloba a los orgánulos celulares. Además de estos componentes, hay un amplio sistema de túbulos y filamentos que forman el citoesqueleto, que proporciona un entramado de apoyo para las estructuras citoplasmicas. Formado principalmente por **microtúbulos, derivados de la tubulina**, y por **microfilamentos derivados de la actina**, este armazón estructural mantiene la forma de la célula, facilita la movilidad celular y sujeta a los distintos orgánulos.

Uno de los orgánulos, el **retículo endoplasmático** membranoso (**ER**), compartimentaliza al citoplasma, incrementando enormemente la superficie disponible para la síntesis bioquímica. El ER puede ser liso, en cuyo caso sirve como lugar para la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos, o puede ser rugoso, así llamado por encontrarse en él los ribosomas. Los ribosomas son lugares para la traducción de la información genética, que se encuentra en el RNA mensajero (mRNA), en proteínas.

Para la actividad de la célula eucariota hay otras tres estructuras citoplásmicas muy importantes: las mitocondrias, los cloroplastos y los centriolos. Las **mitocondrias** se encuentran tanto en células animales como en vegetales y son los lugares para las fases oxidativas de la respiración celular. Estas reacciones químicas generan grandes cantidades de adenosina trifosfato (ATP), una molécula rica en energía. Los **cloroplastos** se encuentran en vegetales superiores, algas y algunos protozoos. Estos orgánulos están asociados con la fotosíntesis, el principal proceso de captación de energía de nuestro planeta. Tanto las mitocondrias como los cloroplastos tienen un tipo de DNA distinto del que se encuentra en el núcleo. Además, estos orgánulos pueden autoduplicarse, transcribir y traducir su información genética. Es interesante advertir que la maquinaria genética de las mitocondrias y de los cloroplastos se parece muchísimo a la de las células procariotas. Esta y otras observaciones han llevado a proponer que estos orgánulos fueron tiempo atrás organismos primitivos de vida libre que establecieron relaciones simbióticas con una célula eucariótica primitiva. Esta teoría, que se refiere al origen evolutivo de estos orgánulos, se denomina la **hipótesis endosimbiótica**.

Las células animales y algunas vegetales tienen también un par de estructuras complejas llamadas **centriolos.** Estos cuerpos citoplásmicos, que se encuentran en una región especializada denominada centrosoma, están asociados con la organización de las fibras del huso, que actúan en la mitosis y en la meiosis. En algunos organismos, el centriolo deriva de otra estructura, el cuerpo basal, que está asociado con la formación de cilios y flagelos. Durante años se ha sugerido en muchas publicaciones que los centriolos y los cuerpos basales tienen DNA, que estaría implicado en la duplicación de estas estructuras. En la actualidad se cree que no es así.

La organización de las **fibras del huso** por los centriolos se lleva a cabo en las primeras fases de la mitosis y de la meiosis. Estas fibras, formadas por un racimo de microtúbulos, juegan un papel importante en el movimiento de los cromosomas, cuando se separan en la división celular. Los microtúbulos constan de polímeros de subunidades polipeptídicas de la proteína tubulina.

2.2 En los organismos diploides los cromosomas forman parejas homólogas

Cuando discutimos los procesos de la mitosis y de la meiosis es importante entender el concepto de cromosomas homólogos. Su comprensión será también muy importante cuando hablemos de la genética mendeliana. Los cromosomas se visualizan más fácilmente en la mitosis. Cuando se examinan con cuidado, se observa que tienen un tamaño y una forma característicos. Cada cromosoma tiene una región condensada, o constreñida, llamada **centrómero**, que confiere la apariencia general de cada cromosoma. La Figura 2.3 ilustra cromosomas con centrómeros situados en posiciones diferentes a lo largo de los mismos. A ambos lados del centrómero se sitúan los brazos cromosómicos. Dependiendo de la posición del centrómero, los brazos tienen longitudes relativas distintas. Como se indica en la Figura 2.3, los cromosomas se clasifican en **metacéntricos**, **submetacéntricos** y **acrocéntricos** o **telocéntricos** de acuerdo con la localización del centrómero[2]. Por convención, el brazo más corto es el que se encuentra por encima del centrómero y se denomina **brazo p** (*p* de «pequeño»). El brazo mas largo se encuentra debajo y se denomina el **brazo q** (por ser *q* la letra siguiente del alfabeto).

Estudiando la mitosis podemos hacer otras observaciones importantes. Primero, todas las células somáticas de los individuos de una misma especie tienen el mismo número de cromosomas. En la mayoría de los casos representa al **número diploide (2*n*)**. Cuando se examina la longitud de tales cromosomas y la situación del centrómero, surge un segundo rasgo general. En relación con estos dos criterios, casi todos los cromosomas se encuentran formando parejas. Los miembros de cada par se denominan **cromosomas homólogos**. Para cada cromosoma con una longitud y una situación del centrómero específicas, existe otro cromosoma con rasgos idénticos. Desde luego, hay excepciones a esta regla. Las bacterias y los virus tienen un único cromosoma, y ciertos vegetales, como los briófitos (musgos) pasan la fase predominante de su ciclo de vida en estado haploide. Es decir, tienen un único miembro de cada pareja de cromosomas homólogos durante gran parte de su ciclo.

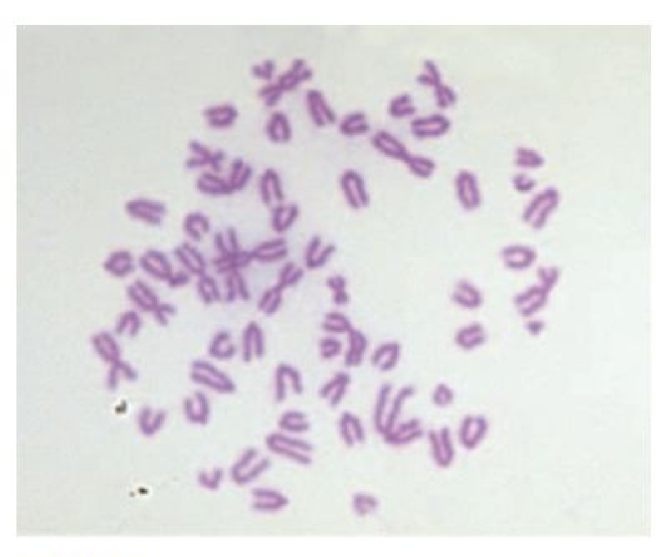
En la Figura 2.4 se presenta la apariencia física de diferentes parejas de cromosomas homólogos. En dicha figura, los cromosomas mitóticos humanos se han fotografiado, se han recortado de la foto y se han emparejado, formando un **cariotipo**[3].

Localización del centrómero	Denominación	Forma en metafase	Forma en anafase
Central	Metacéntrico	Brazo p Centrómero Brazo q	Migración
Entre el centro y el extremo	Submetacéntrico		
Próxima al extremo	Acrocéntrico		
En el extremo	Telocéntrico		

FIGURA 2.3 Tipos de cromosomas basados en la localización del centrómero. Adviértase que la forma del cromosoma en la anafase viene determinada por la posición del centrómero.

[2] *Nota del traductor:* existe un cuarto tipo, los llamados cromosomas puntuales, de muy pequeño tamaño, en los que no se aprecian brazos.

[3] *Nota del traductor:* estrictamente, el cariotipo es el conjunto de los cromosomas característico de una especie, mientras que su disposición ordenada, como en la parte derecha de la Figura 2.4, se denomina idiograma.



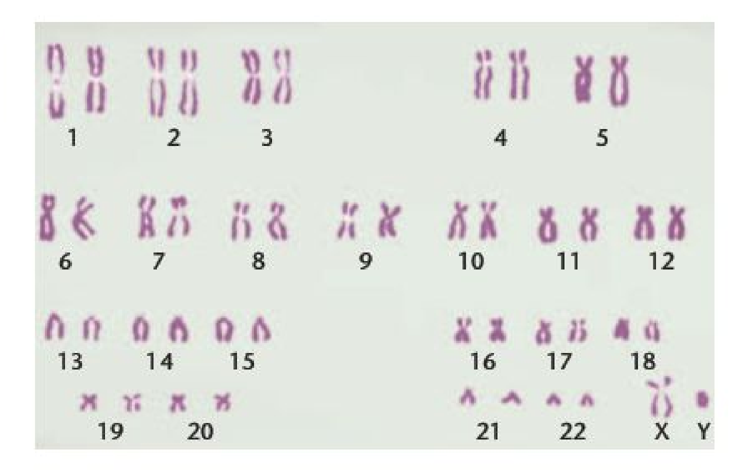


FIGURA 2.4 Preparación metafásica de cromosomas de una célula en división de un varón (izquierda), y el cariotipo que se deriva de la misma (derecha). Todos los cromosomas, excepto el X y el Y, se encuentran formando parejas homólogas. Realmente cada cromosoma es una estructura doble, formada por un par de cromátidas hermanas unidas por un centrómero común.

Como puede verse, la especie humana tiene un número 2*n* de 46, y observado con detalle, los cromosomas presentan una gran diversidad de tamaños y posición del centrómero. Hay que advertir también que cada uno de los 46 cromosomas tiene claramente una estructura doble, con dos **cromátidas hermanas** en paralelo unidas por un único centrómero. Si se permitiera que estos cromosomas continuaran dividiéndose, cada pareja de cromátidas hermanas, que son idénticas entre sí, se separarían hacia dos nuevas células cuando continuase la división.

El número haploide (*n*) de cromosomas es igual a la mitad del número diploide. En conjunto, la dotación completa de genes que contiene una dotación haploide de cromosomas constituye el **genoma** de la especie. Los ejemplos catalogados en la Tabla 2.1 demuestran que en animales y vegetales se encuentra un amplio rango de valores de *n*.

TABLA 2.1 **NÚMERO HAPLOIDE DE CROMOSOMAS DE DIVERSOS ORGANISMOS**

Nombre vulgar	Nombre científico	Número haploide	Nombre vulgar	Nombre científico	Número haploide
Moho negro del pan	*Aspergillus nidulans*	8	Ratón	*Mus musculus*	20
Haba	*Vicia faba*	6	Humano	*Homo sapiens*	23
Gato	*Felis domesticus*	19	Estramonio	*Datura stramonium*	12
Ganado vacuno	*Bos taurus*	30	Mosquito	*Culex pipiens*	3
Aves de corral	*Gallus domesticus*	39	Mostaza	*Arabidopsis thaliana*	5
Chimpancé	*Pan troglodytes*	24	Moho rosa del pan	*Neurospora crassa*	7
Maíz	*Zea mays*	10	Patata	*Solanum tuberosum*	24
Algodón	*Gossypium hirsutum*	26	Mono rhesus	*Macaca mulatta*	21
Perro	*Canis familiaris*	39	Nemátodo	*Caenorhabditis elegans*	6
Primavera de noche	*Oenothera biennis*	7	Gusano de seda	*Bombyx mori*	28
Rana	*Rana pipiens*	13	Moho del cieno	*Dictyostelium discoidium*	7
Mosca de la fruta	*Drosophila melanogaster*	4	Cabeza de dragón	*Antirrhinum majus*	8
Cebolla de jardín	*Allium cepa*	8	Tabaco	*Nicotiana tabacum*	24
Guisante de jardín	*Pisum sativum*	7	Tomate	*Lycopersicon esculentum*	12
Saltamontes	*Melanoplus differentialis*	12	Nenúfar blanco	*Nymphaea alba*	80
Alga verde	*Chlamydomonas reinhardi*	18	Trigo	*Triticum aestivum*	21
Caballo	*Equus caballus*	32	Levadura	*Saccharomyces cerevisiae*	16
Mosca doméstica	*Musca domestica*	6	Pez cebra	*Danio rerio*	25

Las parejas de cromosomas homólogos tienen una semejanza genética importante. Tienen genes idénticos, situados en el mismo lugar a lo largo del cromosoma, al que se denomina **locus** (en plural, **loci**). Por ello, tienen idéntico potencial genético. En organismos con reproducción sexual, uno de los miembros de cada pareja proviene de la madre (a través del óvulo) y otro del padre (a través del esperma). Por ello, y como consecuencia de la **herencia biparental**, cada organismo diploide tiene dos copias de cada uno de los genes. Como veremos en los capítulos sobre la genética de la transmisión, los miembros de cada par de genes, aunque influyen en el mismo carácter, no son necesariamente idénticos. En una población de individuos de la misma especie, pueden existir muchas formas alternativas del mismo gen, llamados **alelos**.

Los conceptos de número haploide, número diploide y cromosomas homólogos son importantes para entender la meiosis. Durante la formación de los gametos, o de las esporas, la meiosis reduce el número diploide de cromosomas al número haploide. Por ello, los gametos, o esporas, haploides tienen exactamente un miembro de cada una de las parejas de cromosomas —es decir, una dotación haploide completa. Después de la fusión de los dos gametos en la fecundación, se restablece el número diploide; es decir, el zigoto tiene dos dotaciones haploides completas de cromosomas. De esa manera se mantiene la constancia del material genético de generación en generación.

¿CÓMO LO SABEMOS?

Con la primera aparición de este apartado es adecuada una breve introducción. A lo largo del texto, varias veces en cada capítulo, identificaremos cuestiones de investigación importantes que se han resuelto como consecuencia de experimentación genética. Se le pide que relacione cada cuestión con la discusión previa y que revise cómo se adquirió la información que aclaró el descubrimiento científico. Creemos que estos sencillos ejercicios estimularán y perfilarán su habilidad analítica.

¿Cómo sabemos que los cromosomas forman parejas homólogas?

En el concepto de parejas de cromosomas homólogos hay una excepción importante. En muchas especies, los miembros de una pareja, los **cromosomas que determinan el sexo**, no tienen, normalmente, igual tamaño, igual situación del centrómero, la misma proporción entre los brazos, o el mismo contenido genético. Por ejemplo, en la especie humana, las mujeres tienen dos cromosomas X homólogos, mientras que los varones tienen, además de un cromosoma X, un cromosoma Y (Figura 2.4). Los cromosomas X e Y no son estrictamente homólogos. El Y es considerablemente de menor tamaño y carece de la mayoría de los loci que se encuentran en el cromosoma X. No obstante, en la meiosis se comportan como homólogos, por lo que los gametos producidos por los varones reciben un cromosoma X o un Y.

2.3 La mitosis reparte los cromosomas en las células hijas

La mitosis es básica para todos los organismos eucariotas. En muchos organismos unicelulares, como los protozoos y algunos hongos y algas, la mitosis (como parte de la división celular) proporciona la base para su reproducción asexual. Los organismos pluricelulares diploides comienzan su ciclo biológico como óvulos fecundados unicelulares llamados **zigotos**. La actividad mitótica del zigoto y de las células hijas posteriores es la base para el crecimiento y desarrollo del organismo. En organismos adultos, la actividad mitótica es esencial en la cicatrización de las heridas y en otros tipos de sustitución de células en ciertos tejidos. Por ejemplo, en la especie humana, las células epidérmicas se están desprendiendo y reemplazando continuamente. En los vertebrados, la división celular da lugar también a una producción continua de reticulocitos, que eliminarán finalmente sus núcleos y repondrán el número de glóbulos rojos. En situaciones anormales, las células somáticas pueden perder el control de la división celular, originando un tumor.

En la división nuclear, o **cariocinesis,** el material genético se reparte entre las células hijas. Este proceso es muy complejo y requiere de gran precisión. En primer lugar, los cromosomas deben duplicarse de manera precisa y luego repartirse exactamente. El resultado final es la producción de dos núcleos hijos, cada uno con una composición cromosómica idéntica a la de la célula madre.

A la cariocinesis le sigue la división del citoplasma, o **citocinesis**. La división del citoplasma, menos compleja, requiere un mecanismo que dé lugar a un reparto del mismo en dos partes, seguido del confinamiento de las dos nuevas células dentro de una membrana plasmática diferente. Los orgánulos citoplásmicos, o bien se autoduplican a partir de las estructuras membranosas existentes, o se sintetizan *de novo* en cada célula. La proliferación posterior de estas estructuras es un mecanismo razonable y adecuado para la reconstitución del citoplasma de las células hijas.

Después de la división celular, el tamaño inicial de las nuevas células hijas es aproximadamente la mitad del tamaño de la célula madre. Sin embargo, el núcleo de cada una de las nuevas células no es apreciablemente menor que el núcleo de la célula de donde provienen. La medida cuantitativa del DNA confirma que hay una cantidad equivalente de material genético en los núcleos hijos respecto del núcleo materno.

La interfase y el ciclo celular

Muchas células presentan una alternancia continua entre división y no división. Lo que sucede desde que termina una división hasta que comienza la división siguiente constituye el **ciclo celular** (Figura 2.5). Consideraremos el estadio inicial del ciclo, llamado **interfase,** como el intervalo entre dos divisiones. Antes se creía que la actividad bioquímica en la interfase se dedicaba exclusivamente al crecimiento celular y a su funcionamiento normal. Sin embargo, sabemos ahora que hay otra actividad bioquímica, esencial para la siguiente mitosis, que se produce durante la interfase: *la replicación del DNA de cada cromosoma*. El periodo en el que se sintetiza el DNA se denomina **fase S** y tiene lugar antes de que la célula inicie la mitosis. Se puede detectar el momento del comienzo y finalización de la síntesis, siguiendo la incorporación de precursores radioactivos del DNA.

Investigaciones de este tipo han demostrado la existencia de dos periodos durante la interfase, antes y después de la fase S, en los que no se sintetiza DNA. Estas fases se denominan **G1 (gapI)** y **G2 (gapII)**, respectivamente. En ambas fases, así como durante la fase S, hay intensa actividad metabólica, crecimiento y diferenciación celular. Hacia el final de la G2, el volumen celular prácticamente se ha duplicado, el DNA se ha replicado y se ha iniciado la mitosis (M). Después de la mitosis, las células que están continuamente dividiéndose, repiten este ciclo (G1, S, G2, M) una y otra vez, como se muestra en la Figura 2.5.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se abordó experimentalmente la demostración de que el DNA se duplica durante la interfase?

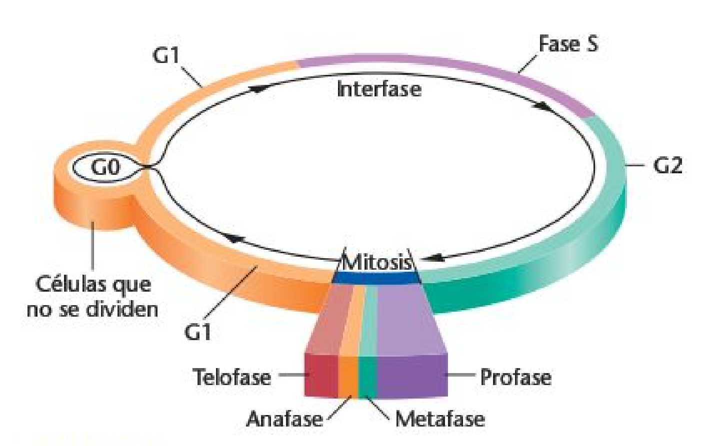
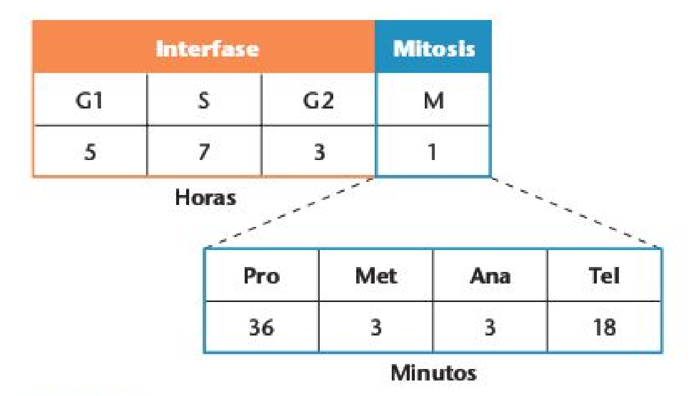


FIGURA 2.5 Intervalos que se encuentran en un ciclo celular típico. Después de la mitosis, la célula inicia la fase G1 de la interfase, comenzando un nuevo ciclo. Las células pueden no dividirse (G0) o continuar por G1, obligándose a comenzar la síntesis de DNA (S) y completar el ciclo (G2 y mitosis). Después de la mitosis se producirán dos células hijas y el ciclo comenzará de nuevo para ambas células.

Gran parte del conocimiento del ciclo celular se basa en estudios *in vitro* (del latín «en vidrio», que significa en un tubo de ensayo). Mientras que la duración total del ciclo celular varía entre células *in vivo* (en organismos vivos), cuando crecen *in vitro* (en cultivo) muchas células completan el ciclo en unas 16 horas. La mitosis ocupa sólo una pequeña parte del ciclo, a menudo menos de una hora. La duración de las fases S y G2 de la interfase son bastante similares en diferentes tipos celulares. La mayor variación se da en la duración del periodo G1. En la Figura 2.6 se presenta la duración relativa de estos periodos en una célula humana en cultivo.

La fase G1 tiene gran interés en el estudio de la proliferación celular y en su control. En un momento tardío de G1, todas las células siguen uno de estos dos caminos. O bien abandonan el ciclo y entran en una fase de reposo, la llamada **fase G0** (véase la Figura 2.5), o bien son obligadas a iniciar la síntesis de DNA y completar el ciclo. Las células que entran en la fase G0 permanecen viables y activas metabólicamente, pero no se dividen. Aparentemente, las células cancerosas evitan entrar en G0 o pasan muy rápidamente por ella. Otras células entran en G0 y nunca reinician el ciclo celular. Y aun hay otras que permanecen en G0, pero pueden ser estimuladas para volver a G1, continuando el ciclo celular.

Citológicamente la interfase se caracteriza por la ausencia de cromosomas visibles. En su lugar, es evidente que el núcleo diferenciado está lleno de fibras de cromatina, que se han formado a medida que los cromosomas se han desespiralizado y dispersado después de la mitosis anterior. Esto se representa esquemáticamente en la la Figura 2.7(a). Una vez se han completado G1, S y G2, se inicia la mitosis. La mitosis es un periodo dinámico de actividad continua y vigorosa. Para su mejor comprensión, todo el proceso se subdivide en fases discretas y se asignan sucesos concretos a cada una. Estos estadios, en orden secuencial, son la **profase**, la **prometafase**, la **metafase**, la **anafase** y la **telofase.** Al igual que la interfase, estas fases también se esquematizan en la Figura 2.7. Junto a cada esquema se muestra una fotografía de cada fase.



Interfase			Mitosis
G1	S	G2	M
5	7	3	1

Horas

Pro	Met	Ana	Tel
36	3	3	18

Minutos

FIGURA 2.6 Duración de cada fase de un ciclo celular completo de una célula humana en cultivo. Los tiempos varían de acuerdo con los tipos celulares y las condiciones de cultivo.

Profase

A menudo, la profase dura la mitad de la mitosis [Figura 2.7(b)], una fase que se caracteriza por diversas actividades esenciales. Uno de los hechos más tempranos de la profase en todas las células animales es la migración de dos pares de centriolos hacia extremos opuestos de la célula. Estas estructuras se encuentran próximas a la envoltura nuclear, en una zona del citoplasma diferenciado denominado **centrosoma**. Se cree que cada par de centriolos consta de una unidad madura y un centriolo más pequeño recién formado.

La dirección de la migración de los centriolos es tal que se establecen dos polos en extremos opuestos de la célula. Una vez han migrado, los centriolos son responsables de la organización de los microtúbulos citoplásmicos, lo que da lugar a una serie de **fibras del huso** que van de polo a polo. Esto da lugar a un eje, a lo largo del cual se produce la separación de los cromosomas. Es interesante advertir que en la mayor parte de las células vegetales (con muy pocas excepciones), de los hongos y en ciertas algas, parece que no hay centriolos. Sin embargo, en la mitosis se ven muy bien las fibras del huso. Por ello se puede decir que los centriolos no son las únicas estructuras responsables de la organización de las fibras del huso.

A medida que los centriolos migran, la envoltura nuclear comienza a descomponerse y desaparecer gradualmente. De igual manera, los nucleolos del interior del núcleo se desintegran. Mientras suceden estos hechos, las fibras de la cromatina difusa comienzan a condensarse, un proceso que continúa hasta que se hacen visibles diferentes estructuras filamentosas, los cromosomas. Cerca del final de la profase queda claro que cada cromosoma es una estructura doble, escindida longitudinalmente, excepto en una constricción puntual, el centrómero. Cada una de las dos partes del cromosoma se denominan **cromátidas.** Ya que el DNA que contiene cada par de cromátidas es el resultado de la duplicación de un único cromosoma, estas son genéticamente idénticas. Por consiguiente, se denominan **cromátidas hermanas.** En la especie humana, con un número diploide de 46, la preparación citológica del final de la profase revela 46 de tales estructuras cromosómicas distribuidas aleatoriamente en la zona que anteriormente ocupaba el núcleo.

Prometafase y Metafase

El hecho diferencial en la siguiente fase es la migración de cada cromosoma, dirigido por la región centromérica, hacia el plano ecuatorial. En algunas publicaciones el término **prometafase** se refiere al periodo en el que los cromosomas se desplazan, y la **metafase** se aplica estrictamente a la configuración cromosómica que aparece después de esta migración, tal como se presenta en la Figura 2.7(c). El plano ecuatorial, también denominado placa metafásica, se encuentra en el plano medio de la célula, perpendicular al eje que establecen las fibras del huso.

La migración se hace posible por la unión de las fibras del huso a una estructura asociada con el centrómero de los cromosomas llamada el **cinetocoro**. Esta estructura, formada por multicapas de proteínas, se forma en los lados opuestos de cada centrómero, asociándose íntimamente con las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma. Una vez unidos a los microtúbulos que forman las fibras del huso, las cromátidas hermanas están listas para ser atraídas a los polos opuestos en el siguiente estadio de la anafase.

Sabemos bastantes cosas acerca de las fibras del huso. Están formadas por **microtúbulos**, los cuales están formados a su vez por subunidades moleculares de la proteína **tubulina**. Parece que los microtúbulos se originan y «crecen» a partir de las dos regiones centroméricas (en donde se encuentran los centriolos) hacia los polos opuestos de la célula. Son estructuras dinámicas, que se alargan o se acortan como consecuencia de la adición o pérdida de subunidades de tubulina polarizadas. Los microtúbulos mas directamente implicados en la migración de los cromosomas en la anafase, entran en contacto y se adhieren a los cinetocoros a medida que crecen desde la región centrosómica. Se denominan **microtúbulos cinetocóricos** y tienen uno de sus extremos cerca de la región centrosómica (en uno de los polos de la célula) y el otro extremo anclado al cinetocoro. Es interesante advertir que el número de microtúbulos que se unen al cinetocoro varía mucho en diversos organismos. En la levadura (*Saccharomyces*) hay un solo microtúbulo unido a cada una de las estructuras laminares del cinetocoro. En el otro extremo se encuentran las células mitóticas de los mamíferos, en donde a cada parte del cinetocoro se unen de 30 a 40 microtúbulos.

Cuando termina la metafase, cada centrómero se encuentra alineado en la placa metafásica, con los brazos cromosómicos extendidos hacia fuera, en una disposición aleatoria. Esta configuración se muestra en la Figura 2.7(d).

Anafase

En la **anafase**, que es la más breve, ocurren los fenómenos esenciales que tienen que ver con la distribución de los cromosomas en la mitosis. Es en esta fase en la que las cromátidas hermanas de cada cromosoma *se separan* y migran hacia los extremos opuestos de la célula. Para que se dé una separación completa, cada región centromérica tiene que dividirse en dos. Este hecho indica el inicio de la anafase. Una vez que ha ocurrido esto, cada cromátida se denomina, a partir de ahora, **cromosoma hijo**.

El movimiento de los cromosomas hijos a los polos opuestos de la célula depende de la unión entre las fibras del huso y el centrómero. Investigaciones recientes han puesto de manifiesto que la migración de los cromosomas es consecuencia de la actividad de una serie de proteínas específicas, denominadas en general proteínas motoras. Estas proteínas utilizan la energía generada por la hidrólisis del ATP, y se dice que su actividad constituyen los **motores moleculares** de la célula. Estos motores actúan en diversos puntos de las células en división, y están todos ellos implicados en la actividad de los microtúbu-

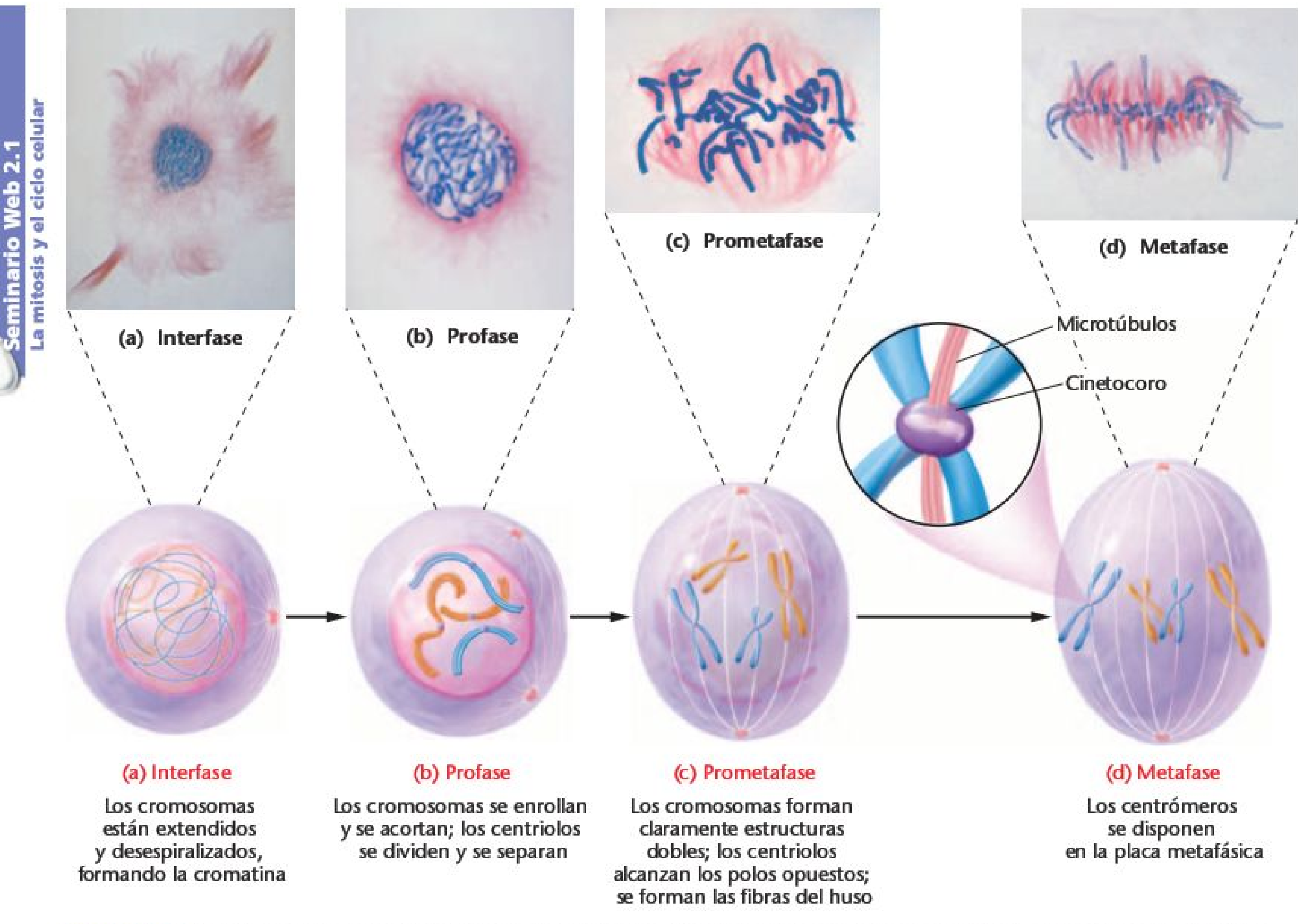


FIGURA 2.7 Mitosis en una célula animal con un número diploide igual a 4. En el texto se describe lo que sucede en cada fase. De las dos parejas de cromosomas homólogos, una tiene cromosomas metacéntricos largos y la otra cromosomas submetacéntricos más cortos. Los cromosomas paternos y maternos se muestran en colores distintos. En (f) se muestra la telofase tardía de una célula vegetal, con la formación de la placa celular y la ausencia de centriolos. Las micrografías con microscopio óptico que ilustran las fases de la mitosis corresponden a la flor de *Haemanthus*.

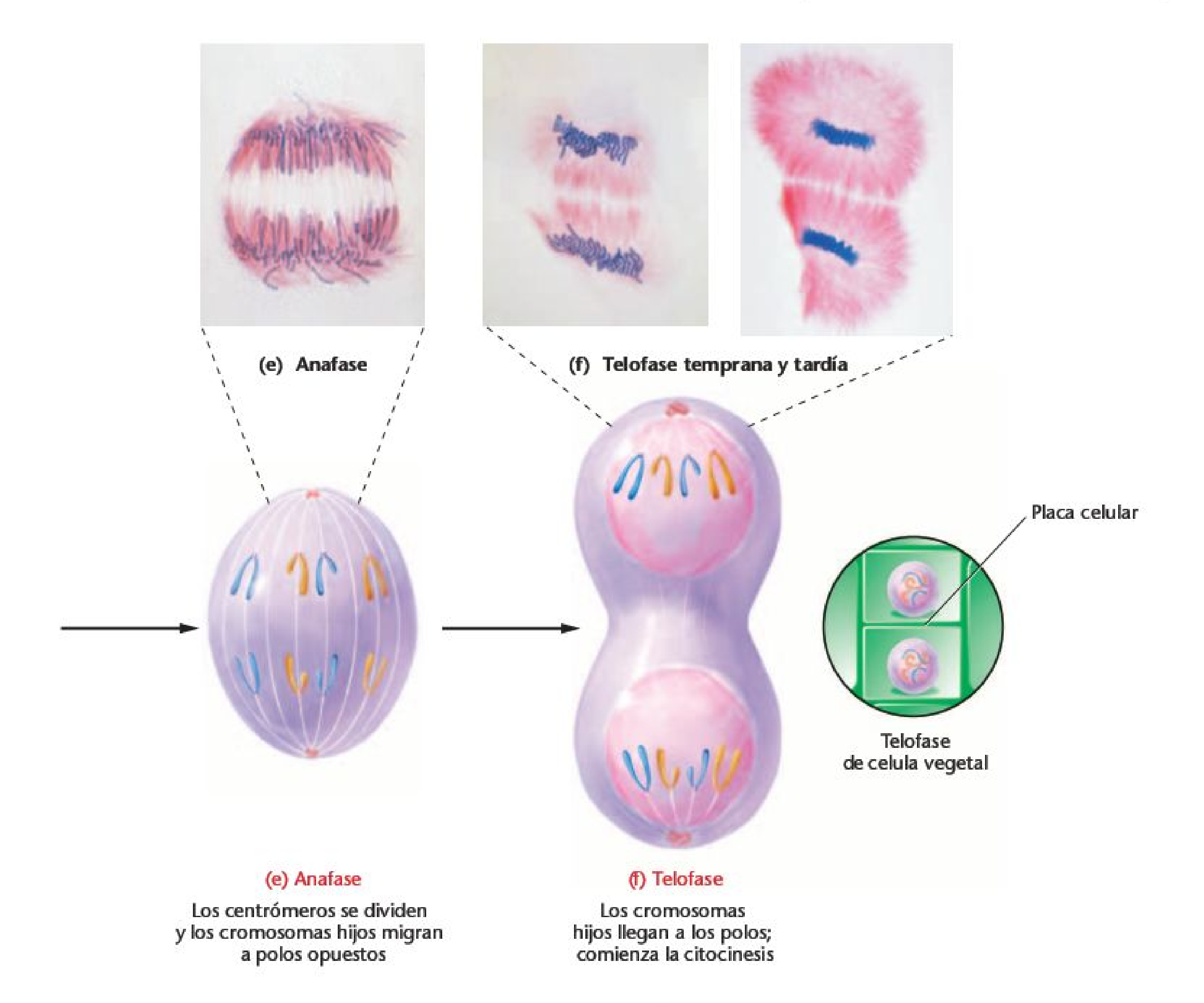
los que finalmente sirven para impulsar a los cromosomas a extremos opuestos de la célula. Los centrómeros de cada cromosoma *parece* que dirigen la dirección de la migración, con los brazos cromosómicos remolcados detrás. La situación del centrómero determina la forma del cromosoma durante su separación. (*Véase* la Figura 2.3.)

Los pasos que ocurren en la anafase son esenciales para proporcionar a cada célula hija una dotación idéntica de cromosomas. En células de la especie humana tendría que haber en este momento 46 cromosomas en cada polo, uno de cada una de las parejas hermanas originales. En la Figura 2.7(e) se presenta la anafase antes de su finalización.

Telofase

La **telofase** es la fase final de la mitosis y se representa en la Figura 2.7(f). En su comienzo hay dos dotaciones completas de cromosomas, una en cada polo. El hecho más significativo es la **citocinesis**, la división o partición del citoplasma. La citocinesis es esencial si a partir de una única célula se han de producir dos nuevas células. El mecanismo difiere mucho entre células animales y vegetales. En las células vegetales, se sintetiza una **placa celular** que atraviesa a la célula en división, en la región de la placa metafásica. Sin embargo, las células animales sufren una constricción del citoplasma, de manera muy similar a como lo provocaría el lazo de una cuerda apretando la zona ecuatorial de un globo. El resultado final es el mismo: se forman dos células independientes.

No es sorprendente que el proceso de la citocinesis sea diferente en células de distintos organismos. En las células vegetales, que tienen una forma más regular y que son estructuralmente rígidas, se requiere un mecanismo para la depo-



sición de la nueva pared celular alrededor de la membrana plasmática. La placa celular, que se forma en la telofase, se convierte en la **lámina media**. Posteriormente, las capas primaria y secundaria de la pared celular se depositan entre la membrana celular y la lámina media, a ambos lados del límite entre las dos células hijas. En los animales, una vez completada la constricción de la membrana celular se produce el **surco celular,** característico de las células recién divididas.

Hacia el final de la telofase, se inician también otros procesos necesarios para la transición de mitosis a interfase. Representan una inversión generalizada de aquellos sucesos que se han producido en la profase. En cada nueva célula, los cromosomas comienzan a desespiralizarse y quedan de nuevo como cromatina difusa, mientras que se rehace la envoltura nuclear a su alrededor. Los nucleolos se forman de nuevo gradualmente y quedan totalmente visibles en el núcleo en la interfase temprana. También desaparecen las fibras del huso. Al final de la telofase la célula entra en interfase.

Ahora resuelva esto

Con la primera aparición de lo que llamamos «Ahora resuelva esto», es adecuada una pequeña introducción. Se encontrará varias veces en este y en los siguientes capítulos; cada entrada identifica un problema de la sección Problemas y preguntas a discusión al final del capítulo. Cada cuestión seleccionada se relaciona con la discusión que se acaba de presentar. Se hace un comentario acerca del problema y luego se ofrece una sugerencia. Cada sugerencia proporciona herramientas analíticas que serán útiles para resolver el problema.

En el Problema 2.5 de la página 41 es necesario entender qué sucede a cada par de cromosomas homólogos durante la mitosis.

Sugerencia: La idea mas importante para resolver este problema es entender que, mediante la mitosis, los miembros de cada pareja de homólogos no van en pareja, sino que se comportan individualmente.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo aprenderíamos acerca de las distintas fases de la mitosis?

2.4 La meiosis reduce el número de cromosomas de diploide a haploide en las células germinales y en las esporas

La meiosis, a diferencia de la mitosis, reduce a la mitad la cantidad de material genético. Mientras que en organismos diploides la mitosis da lugar a células hijas con una dotación diploide completa, en la meiosis se producen gametos o esporas con sólo una dotación haploide de cromosomas. En la reproducción sexual los gametos se combinan y se unen para reconstruir la dotación diploide, tal como se encuentra en las células paternas. En la Figura 2.8 se comparan los dos procesos siguiendo a dos pares de cromosomas homólogos.

La meiosis tiene que ser muy específica, ya que, por definición, los gametos o esporas haploides tienen exactamente uno de los miembros de cada una de las parejas de cromosomas homólogos. Terminada con éxito, la meiosis asegura la continuidad genética de generación en generación. La reproducción sexual asegura también la variación genética entre los individuos de una especie. Cuando estudiemos la meiosis, quedará

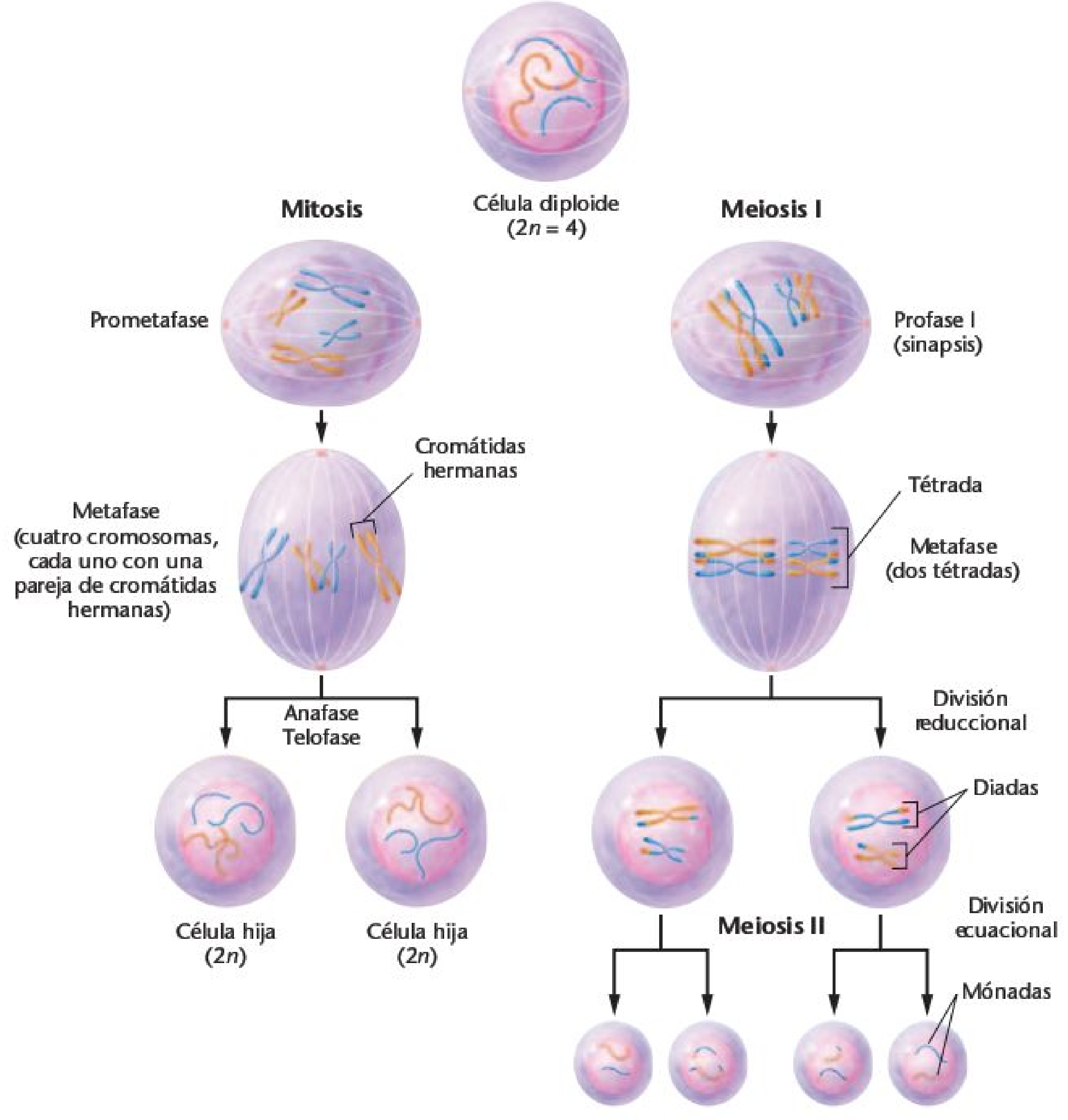


FIGURA 2.8 Visión de conjunto de los principales sucesos y resultados de la mitosis y de la meiosis. Como en la Figura 2.7, se sigue a dos parejas de cromosomas homólogos.

claro que este proceso da lugar a gametos con muchas combinaciones únicas a partir de cromosomas provenientes del padre y de la madre entre las dotaciones haploides. Gracias a la tremenda variación genética de los gametos, en la fecundación es posible un gran número de combinaciones cromosómicas. Además, veremos que el fenómeno meiótico denominado **entrecruzamiento** (o **sobrecruzamiento**) da lugar a intercambio genético entre cada uno de los miembros homólogos de una pareja de cromosomas. Esto produce cromosomas que son un mosaico de los homólogos paterno y materno de los que provienen, intensificando la potencial variación genética de los gametos y de los descendientes derivados de ellos. Por consiguiente, la reproducción sexual baraja el material genético, dando lugar a descendientes que a menudo difieren mucho de sus padres. Este proceso constituye la forma mas importante para combinar información genética dentro de una especie.

Panorama de la meiosis

En la discusión anterior hemos establecido lo que podríamos considerar como los objetivos de la meiosis. Antes de considerar sistemáticamente las fases de este proceso, examinaremos brevemente de qué manera las células diploides se convierten en gametos o esporas haploides. En la discusión siguiente nos referiremos a la parte de la meiosis de la Figura 2.8.

Ya hemos visto que en la mitosis, cada uno de los miembros paternos y maternos de una pareja dada de cromosomas homólogos se comporta de manera autónoma en la división. En contraste, al comienzo de la meiosis, los cromosomas homólogos forman parejas; es decir, sufren **sinapsis**. Cada estructura en sinapsis, denominada **bivalente**, que finalmente dará lugar a una unidad, la **tétrada**, consta de cuatro cromátidas. La presencia de cuatro cromátidas demuestra que ambos homólogos (que forman el bivalente) se han duplicado de hecho. Por consiguiente, para alcanzar la haploidía son necesarias dos divisiones. En la meiosis I, denominada **división reduccional** (debido a que el número de centrómeros, cada uno de los cuales representa a un cromosoma, se *reduce* a la mitad después de esta división), los componentes de cada tétrada —que representa a los dos homólogos— se separan, produciendo dos **diadas**. Cada diada está compuesta por dos cromátidas hermanas unidas por un único centrómero. En la meiosis II, denominada **ecuacional** (ya que el número de centrómeros permanece «constante»[4] después de esta división), cada diada se escinde en dos **mónadas** de un solo cromosoma cada una. Así, las dos divisiones pueden dar lugar potencialmente a cuatro células haploides.

[4] *Nota del traductor:* el término ecuacional viene de la traducción literal de la término inglés «equational», que a su vez viene del hecho de que los centrómeros quedan «igual» («equal» en inglés), es decir, permanecen constantes.

La primera división meiótica: la profase I

Volvamos ahora a una descripción detallada de la meiosis. Como la mitosis, la meiosis es un proceso continuo. Nombraremos las partes de cada fase de la división sólo para facilitar la discusión. Desde el punto de vista genético hay tres hechos que caracterizan la fase inicial, la profase I (Figura 2.9). Primero, como en la mitosis, la cromatina presente en la interfase engrosamientos y espiralizaciones dando lugar a cromosomas visibles. Segundo, a diferencia de la mitosis, los miembros

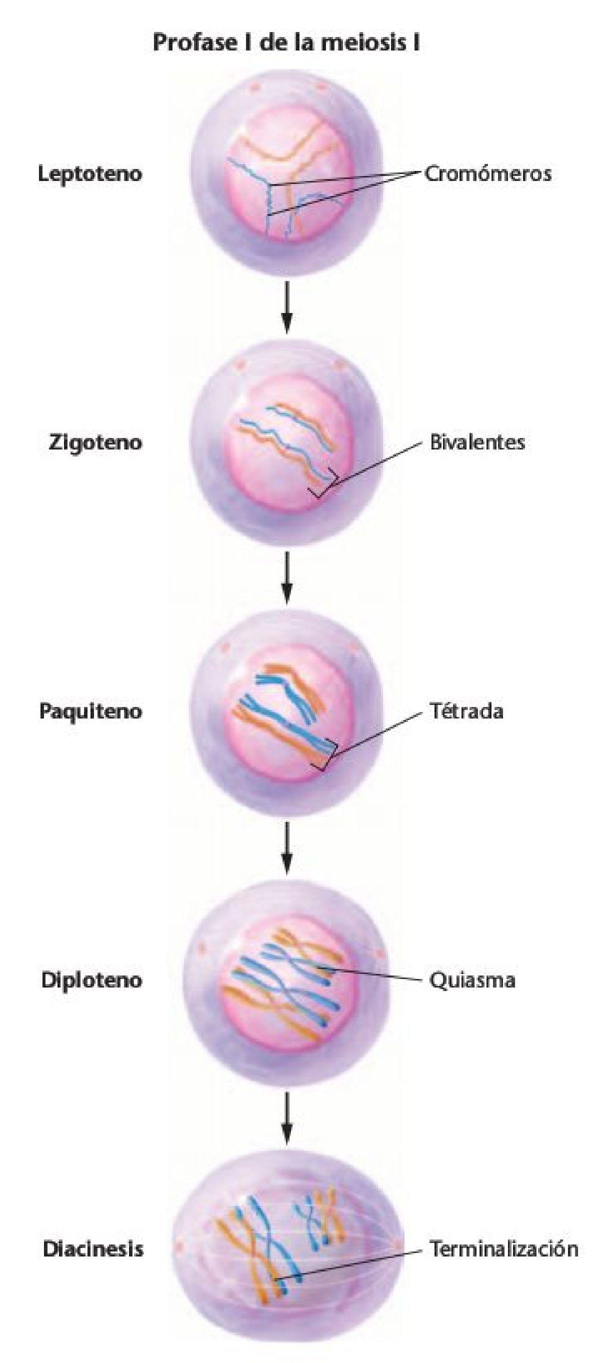


FIGURA 2.9 Subfases de la profase I de la meiosis para los cromosomas representados en la Figura 2.8.

homólogos de cada par de cromosomas sufren la sinapsis. Tercero, entre los homólogos en sinapsis se producen entrecruzamientos, un proceso de intercambio. Debido a la complejidad de estos fenómenos genéticos, esta fase de la meiosis se ha subdividido en cinco subfases: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Cuando discutamos dichas subfases, hay que tener en cuenta que, aun cuando no es totalmente aparente en las primeras fases de la meiosis, el DNA de los cromosomas se ha duplicado en la interfase anterior.

Leptoteno En la **subfase leptoteno**, el material cromatínico interfásico comienza a condensarse y los cromosomas, aunque todavía extendidos, se hacen visibles. A lo largo de cada cromosoma se encuentran los **cromómeros**, que son condensaciones localizadas que recuerdan a las cuentas de un collar. Pruebas recientes sugieren que es durante el leptoteno cuando comienza el proceso denominado **búsqueda del homólogo** que precede y es esencial para el inicio del apareamiento de los homólogos.

Zigoteno Los cromosomas continúan acortándose y engrosándose en la **subfase zigoteno**. En el proceso de búsqueda del homólogo, los cromosomas homólogos sufren un alineamiento inicial entre sí, que se completa hacia el final del zigoteno. A medida que prosigue la meiosis, entre los homólogos se forma un componente ultraestructural (visible sólo con el microscopio electrónico), denominado **complejo sinaptinémico.** Discutiremos mas tarde esta estructura meiótica.

Cuando termina el zigoteno, los homólogos apareados constituyen una estructura denominada **bivalente**. Aunque los dos miembros de cada bivalente ya han replicado su DNA, todavía no es aparente que cada miembro es una estructura doble. El número de bivalentes de una especie dada es igual a su número haploide (n).

Paquiteno En la transición entre el zigoteno y la **subfase paquiteno**, continúa la espiralización y acortamiento de los cromosomas, con un mayor desarrollo del complejo sinaptinémico que se encuentra entre los dos miembros de cada bivalente. Esto da lugar a un apareamiento más íntimo denominado sinapsis. Comparado con el característico apareamiento preliminar del paquiteno, los homólogos quedan ahora separados sólo por unos 100 nm.

Durante el paquiteno ya es evidente que cada homólogo es una estructura doble, lo que proporciona una prueba visual de la anterior replicación del DNA de cada cromosoma. Así pues, cada bivalente tiene cuatro cromátidas. Como en la mitosis, las réplicas se denominan cromátidas hermanas, mientras que las cromátidas paternas respecto de las maternas de una pareja de homólogos se denominan cromátidas no hermanas[5]. La estructura de cuatro miembros también se denomina **tétrada**, y cada tétrada tiene dos pares de cromátidas hermanas.

[5] *Nota del traductor:* a estas cromátidas también se les suele llamar cromátidas homólogas.

Diploteno Durante la siguiente **subfase diploteno** es incluso mas aparente que cada tétrada consta de dos parejas de cromátidas hermanas. En cada tétrada, cada par de cromátidas hermanas comienza a separarse. Sin embargo, uno o mas puntos permanecen en contacto, que es por donde las cromátidas se han entrelazado. Cada uno de tales puntos se denomina **quiasma** y se cree que representa el lugar en donde las cromátidas no hermanas han sufrido intercambio genético mediante el proceso que denominábamos anteriormente entrecruzamiento. Aunque el intercambio físico entre los cromosomas ocurre en la subfase previa del paquiteno, el resultado del entrecruzamiento es visible sólo cuando los cromosomas duplicados comienzan a separarse. El entrecruzamiento es una fuente importante de variabilidad genética. Como se indicó anteriormente, durante este proceso se forman nuevas combinaciones de material genético.

Diacinesis La subfase final de la profase I es la **diacinesis**. Los cromosomas se separan, pero las cromátidas no hermanas permanecen íntimamente asociadas mediante los quiasmas. A medida que progresa la separación, los quiasmas se desplazan hacia los extremos de la tétrada. Este proceso, denominado **terminalización**, comienza hacia el final del diploteno y se completa durante la diacinesis. En esta última subfase de la profase I, el nucleolo y la envoltura nuclear desaparecen y los dos centrómeros de cada tétrada quedan unidos a las recién formadas fibras del huso. Al final de la profase I, los centrómeros de cada tétrada se encuentran en la placa ecuatorial de la célula.

Metafase, Anafase y Telofase I

El resto de la meiosis se describe en la Figura 2.10. Después de la primera profase meiótica, siguen fases similares a las de la mitosis. En la metafase de la primera división (**metafase I**) los cromosomas se acortan y engrosan al máximo. Son visibles los quiasmas terminales de cada tétrada y parece que son estos lo único que mantiene unidas a las dos cromátidas no hermanas. Cada tétrada interactúa con las fibras del huso, facilitando el movimiento hacia la placa metafásica. El alineamiento de cada tétrada antes de esta primera anafase es al azar. La mitad de cada tétrada será arrastrada a uno u otro polo aleatoriamente y la otra mitad se desplazará al polo opuesto.

Durante las fases de la meiosis I, el par de cromátidas hermanas se mantienen unidas por el centrómero común. Este *no* se divide. En la **anafase I**, la mitad de cada tétrada (una pareja de cromátidas hermanas – denominada **diada**) se separa hacia cada uno de los polos de la célula en división. Este proceso de separación es la base física de lo que denominaremos **disyunción,** que indica la separación de los cromosomas. Ocasionalmente se producen errores en la meiosis y no se consigue dicha separación, como veremos mas tarde en este capítulo. El término **no disyunción** describe tal fallo. Cuando termina la anafase I normal, en cada uno de los polos hay una serie de diadas en número igual al número haploide.

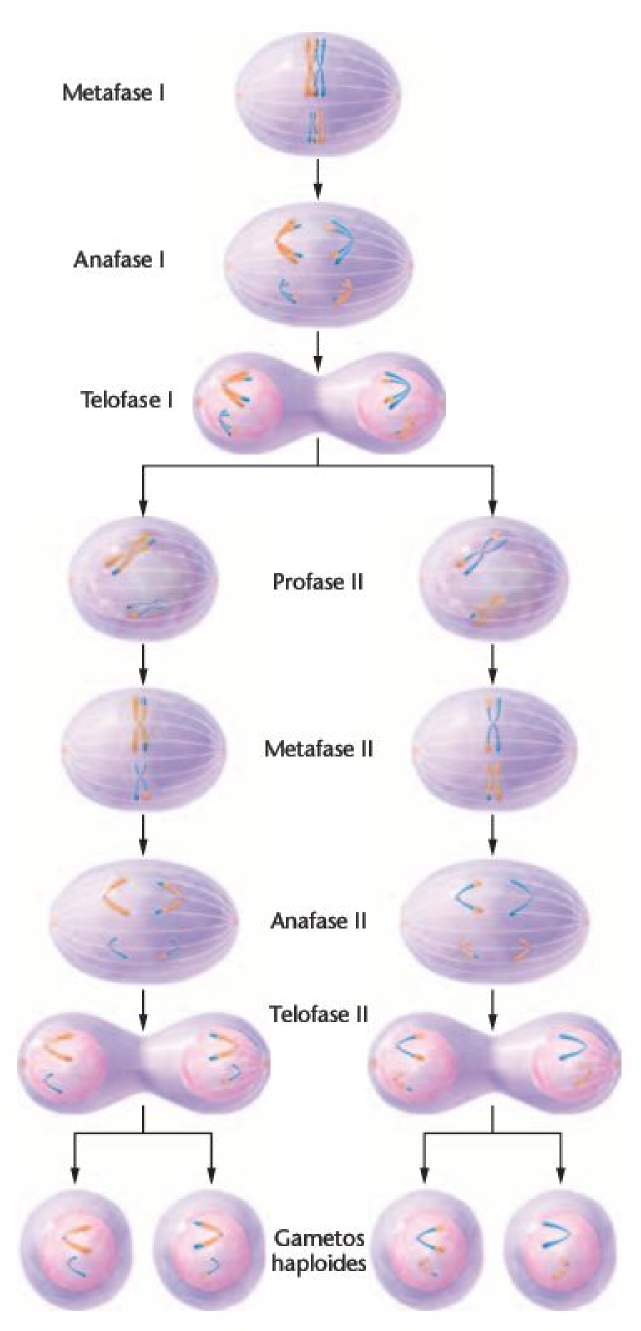


FIGURA 2.10 Los principales sucesos de la meiosis en un animal, con número diploide igual a 4, comenzando con la metafase I. Se puede ver que las combinaciones de cromosomas de las células, que se producen después de la telofase II, dependen del alineamiento aleatorio de cada tétrada y diada en los planos ecuatoriales de las metafases I y II. Se pueden formar otras muchas combinaciones, que no se muestran. Los hechos representados aquí se describen en el texto.

Si no hubiera ocurrido entrecruzamiento en la primera profase meiótica, en cada polo cada diada constaría sólo de cromátidas bien maternas o bien paternas. Sin embargo, el intercambio que se produce por entrecruzamiento origina cromátidas en mosaico de origen paterno y materno.

En la **telofase I** de muchos organismos se forma una membrana nuclear alrededor de las diadas. A continuación el núcleo entra en un corto periodo de interfase. En otros casos las células pasan directamente desde la primera anafase a la segunda división meiótica. Aunque haya un periodo de interfase, los cromosomas no se replican, ya que ya están formados por dos cromátidas. En general, la telofase meiótica es mucho mas corta que la correspondiente fase mitótica.

Seminario Web 2.2
Visión conjunta de la meiosis

La segunda división meiótica

Es esencial que haya una segunda división de las cromátidas hermanas que forman cada diada, denominada **meiosis II**, si cada gameto o espora tiene que recibir sólo una cromátida de cada una de las tétradas originales. Los estadios que caracterizan a la meiosis II se muestran en la mitad inferior de la Figura 2.10. En la **profase II**, cada diada está formada por un par de cromátidas hermanas unidas por un centrómero común. En la **metafase II** los centrómeros se sitúan en la placa ecuatorial. Cuando se dividen, se inicia la **anafase II** y las cromátidas hermanas de cada diada se separan hacia los polos opuestos. Ya que el número de diadas es igual al número haploide, en la **telofase II** se encuentra un miembro de cada pareja de cromosomas homólogos en cada polo. Cada cromosoma se denomina **mónada**. Después de la citocinesis, en la telofase II se pueden producir cuatro gametos haploides como resultado de una única meiosis. Al final de la meiosis, no sólo se habrá conseguido el estado haploide, sino que, si ha habido entrecruzamiento, cada mónada será una combinación de información genética paterna y materna. Por ello, los descendientes que se producen por la unión de gametos recibirán una mezcla de la información genética presente originalmente en sus abuelos paternos o maternos. Por ello, la meiosis incrementa significativamente el nivel de variación genética en cada una de las sucesivas generaciones.

Ahora resuelva esto

El Problema 2.9 de la página 41 requiere la comprensión de lo que sucede en la meiosis a los miembros paternos y maternos de cada par de cromosomas homólogos.

Sugerencia: La idea principal para solucionar este problema es entender que los homólogos paterno y materno están en sinapsis en la meiosis. Una vez que es evidente que cada cromátida se ha duplicado, dando lugar a una tétrada en las primeras fases de la meiosis, cada pareja se comporta como una unidad y da lugar a dos diadas en la anafase I.

¿Cómo lo sabemos?

¿Cómo sabemos que la meiosis tiene un resultado final diferente que la mitosis?

2.5 El desarrollo de los gametos varía durante la espermatogénesis y la oogénesis

Aunque lo que ocurre durante las divisiones meióticas es similar en todas las células que participan en la gametogénesis, en la mayoría de las especies animales hay ciertas diferencias entre la producción de un gameto masculino (espermatogénesis) y la de un gameto femenino (oogénesis). En la Figura 2.11 se resumen estos procesos.

La **espermatogénesis** tiene lugar en los testículos, que son los órganos reproductores masculinos. El proceso comienza con un mayor crecimiento de una célula germinal diploide no diferenciada, denominada **espermatogonio**. Esta célula aumenta de tamaño hasta convertirse en un **espermatocito primario**, que sufre la primera división meiótica. Los productos de esta división se denominan **espermatocitos secundarios**, que tienen un número haploide de diadas. Luego, los espermatocitos secundarios sufren la segunda división meiótica y cada una de estas células produce dos **espermátidas** haploides. Las espermátidas, mediante una serie de cambios en el desarrollo, denominado **espermiogénesis**, se convierten en **esperma** o **espermatozoides** móviles y altamente especializados. Todos los espermatozoides que se producen durante la espermatogénesis reciben igual cantidad de material genético y citoplasma.

En animales maduros del sexo masculino la espermatogénesis puede ser continua o darse periódicamente, determinándose su inicio de acuerdo con la naturaleza del ciclo reproductor de la especie. Los animales que se reproducen durante todo el

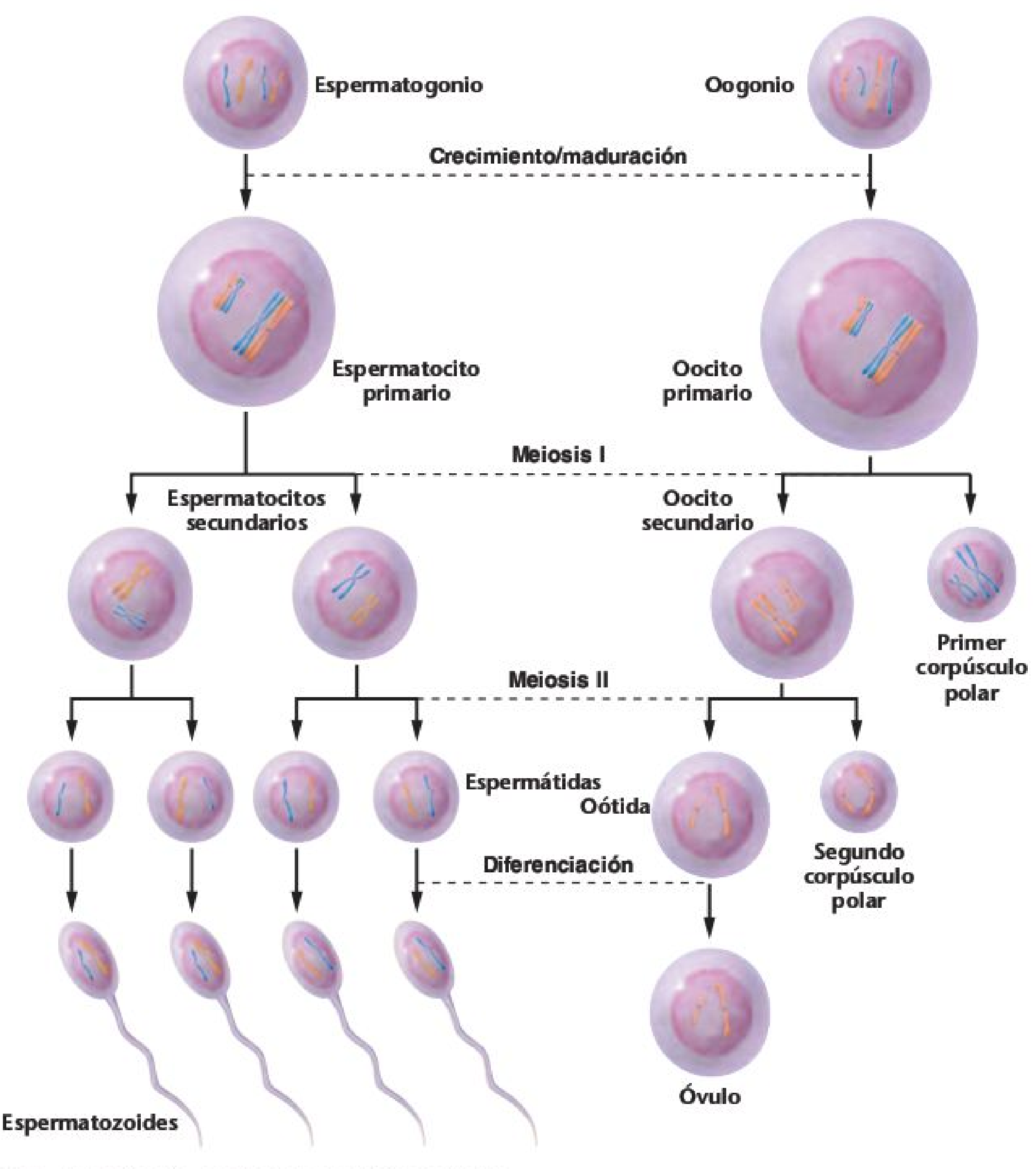


FIGURA 2.11 Espermatogénesis y oogénesis en células animales.

año dan lugar a esperma continuamente, mientras que aquellos que tienen un periodo de reproducción limitado a una estación particular del año, producen esperma solo durante dicho periodo.

En la **oogénesis** animal, la formación de los **óvulos** tiene lugar en los ovarios, los órganos reproductores femeninos. Las células hijas que resultan de las dos divisiones meióticas, reciben igual cantidad de material genético, pero *no* reciben igual cantidad de citoplasma. En cada división celular, casi todo el citoplasma del **oocito primario**, derivado de las **oogonias**, se concentra en una de las dos células hijas. La concentración del citoplasma es necesaria debido a que la función principal del óvulo maduro es nutrir al desarrollo del embrión después de la fecundación.

En la primera anafase meiótica de la oogénesis, se separan las tétradas del oocito primario y las diadas se desplazan hacia los polos opuestos. En la primera telofase, las diadas presentes en un polo se separan rodeadas por muy poco citoplasma para formar el **primer corpúsculo polar**. La otra célula hija que se produce en esta primera división meiótica recibe la mayoría del citoplasma y se denomina **oocito secundario**. El primer corpúsculo polar puede o no dividirse para producir dos pequeñas células haploides. El óvulo maduro se producirá a partir del oocito secundario, en la segunda división meiótica. En esta división el citoplasma del oocito secundario se reparte de nuevo desigualmente, dando lugar a una **oótida** y a un **segundo corpúsculo polar**. La oótida se diferencia posteriormente en el óvulo maduro.

A diferencia de las divisiones de la espermatogénesis, las dos divisiones meióticas de la oogénesis pueden ser no consecutivas. En algunas especies animales las dos divisiones pueden darse una a continuación de la otra. En otras, incluida la especie humana, la primera división de todos los oocitos comienza en el ovario embrionario, pero se detiene en profase I. Muchos años después, se continúa la meiosis en cada oocito justo antes de la ovulación. La segunda división se completa sólo después de la fecundación.

Ahora resuelva esto

El Problema 2.14 de la página 41 implica la comprensión de la meiosis durante la oogenésis.

Sugerencia: Para responder a esta pregunta hay que tener en cuenta que en la meiosis I se dio entrecruzamiento entre las parejas homólogas.

2.6 La meiosis es esencial para el éxito de la reproducción sexual en todos los organismos diploides

La meiosis es esencial para que tenga éxito la reproducción sexual en todos los organismos diploides. Es el mecanismo mediante el cual se reduce la cantidad diploide de información genética a la cantidad haploide. En los animales, la meiosis da lugar a la formación de los gametos, mientras que en los vegetales se producen esporas haploides, que a su vez dan lugar a la formación de gametos haploides.

Además, el mecanismo de la meiosis es la base para la producción de una enorme variación genética entre los miembros de una población. Como ya sabemos, cada organismo diploide tiene su información genética en parejas de cromosomas homólogos, proviniendo un miembro de cada par del padre y otro de la madre. Después de la reducción a la haploidía, los gametos o esporas tienen un representante paterno o materno de cada una de las parejas de cromosomas homólogos. En la reproducción sexual, este proceso tiene el potencial para producir enormes cantidades de gametos genéticamente distintos. A medida que aumenta el número de cromosomas homólogos (el número haploide), aumentan las posibilidades de producir combinaciones diferentes de cromosomas paternos y maternos en cualquier gameto dado. Un organismo puede producir 2^n número de combinaciones, en donde n se refiere al número haploide. Por ejemplo, un organismo con un número haploide igual a 10 producirá 2^{10} o 1.024 combinaciones. Calcule ahora el número de combinaciones diferentes de espermatozoides o de óvulos para nuestra especie: 2^{23}. Cuando obtenga la respuesta, se asombrara del potencial de variación genética que resulta de la meiosis.

El entrecruzamiento en la profase I de la meiosis baraja todavía mas la información genética de los miembros paterno y materno de cada pareja de homólogos. El resultado es que en los gametos se pueden encontrar infinitas variedades de cada homólogo, desde cromosomas paternos o maternos intactos, en donde no se ha dado el intercambio, hasta cualquier combinación de los mismos, dependiendo de si ha ocurrido uno o más intercambios por entrecruzamiento.

En resumen, los dos puntos más significativos de la meiosis son que el proceso es responsable de:

1. el mantenimiento de la constancia de la información genética entre generaciones; y de
2. la producción de enorme variación genética en las poblaciones.

Es importante mencionar brevemente el importante papel que la meiosis juega en los ciclos biológicos de hongos y vegetales. En muchos hongos, el estado predominante del ciclo biológico es el de células vegetativas haploides. Se producen por meiosis y proliferan por división celular mitótica. En los vegetales pluricelulares el ciclo biológico es alternante entre la **fase esporofítica** diploide y la **fase gametofítica** haploide. Mientras que una u otra de estas fases predomina en diferentes grupos vegetales durante esta «alternancia de generaciones», la meiosis y la fecundación constituyen el «puente» entre las generaciones esporofítica y gametofítica (Figura 2.12). Por ello, la meiosis es un componente esencial en el ciclo biológico de los vegetales.

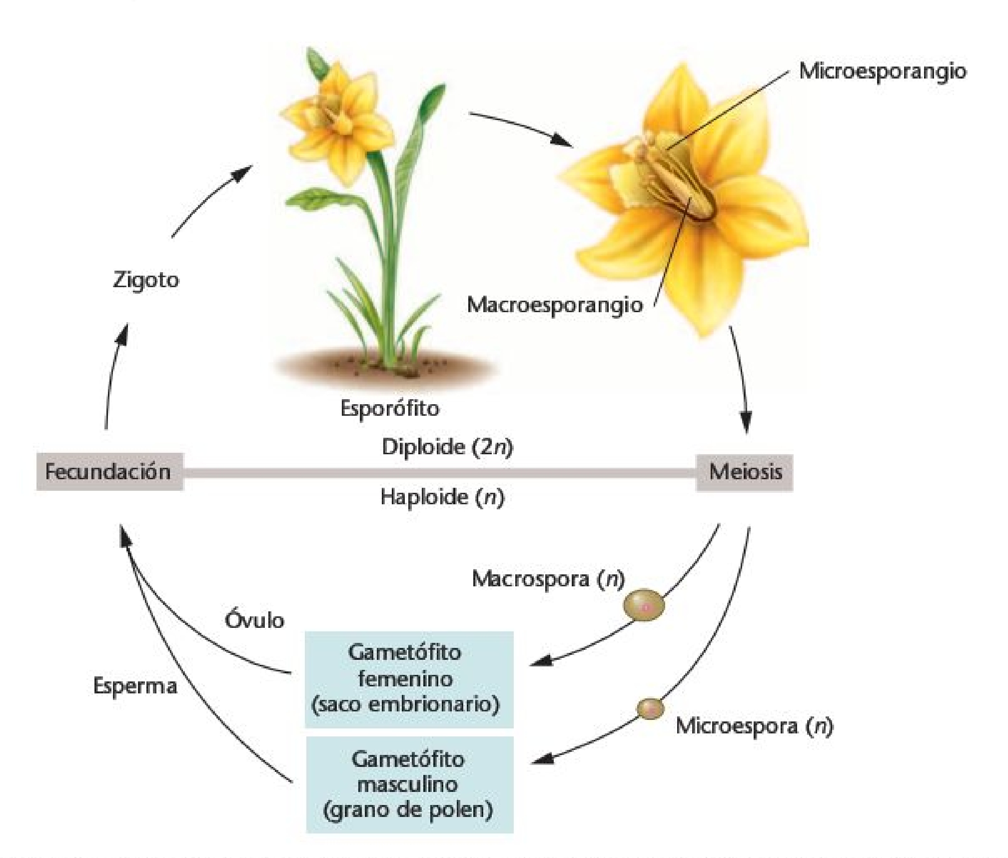


FIGURA 2.12 Alternancia de generaciones entre el esporófito diploide ($2n$) y el gametófito haploide (n) en un vegetal pluricelular. La meiosis y la fecundación hace de puente entre las dos fases del ciclo biológico. Es una angiosperma, en donde la generación esporofítica es la fase predominante.

Finalmente, es importante saber qué sucede cuando la meiosis no produce el resultado esperado. En casos raros, en las meiosis I o II, no se produce la separación o disyunción de las cromátidas de una tétrada o de una diada. Cuando esto ocurre, ambos miembros se dirigen al mismo polo en la anafase. Tal hecho se denomina **no disyunción**, debido a que los dos miembros no se separan. Una no disyunción en meiosis I o II, da lugar a gametos con un número anormal de cromosomas respecto del número haploide. Si tales gametos participan en una fecundación, a menudo se producen descendientes anormales. Este será un tema importante que se discutirá en el Capítulo 8.

Ahora resuelva esto

El Problema 2.20 de la página 42 se refiere a la probabilidad de que cualquier mezcla dada de homólogos paternos o maternos se reúna en un gameto.

Sugerencia: Aquí se deben aplicar las reglas de probabilidad para sucesos múltiples que ocurren independientemente. Esto implica la ley del producto, en donde la probabilidad de que muchos sucesos ocurran simultáneamente es igual al producto de las probabilidades de cada uno.

2.7 La microscopía electrónica ha revelado la naturaleza citológica de los cromosomas mitóticos y meióticos

Hasta aquí nos hemos centrado en los cromosomas mitóticos y meióticos, subrayando su comportamiento en la división celular y en la formación de los gametos. Se podría preguntar porqué los cromosomas son invisibles en la interfase pero visibles en distintas fases de la mitosis y de la meiosis. Estudios con el microscopio electrónico demuestran claramente por qué los cromosomas son visibles solo durante las fases de división.

Cromatina y cromosomas

En el núcleo en interfase se encuentran solo fibras dispersas de cromatina [Figura 2.13(a)]. Sin embargo, una vez comenzada la mitosis, las fibras se espiralizan y se pliegan, condensándose en los cromosomas mitóticos típicos [Figura 2.13(b)]. Si se aflojan las fibras que constituyen los cromosomas mitóticos, las zonas mas desplegadas revelan fibras similares a las que se observan en la cromatina interfásica [Figura 2.13(c)]. Parece que hay muy pocas fibras con extremos libres, y en algunos casos no se observa ninguno. Por el contrario, parece que las fibras

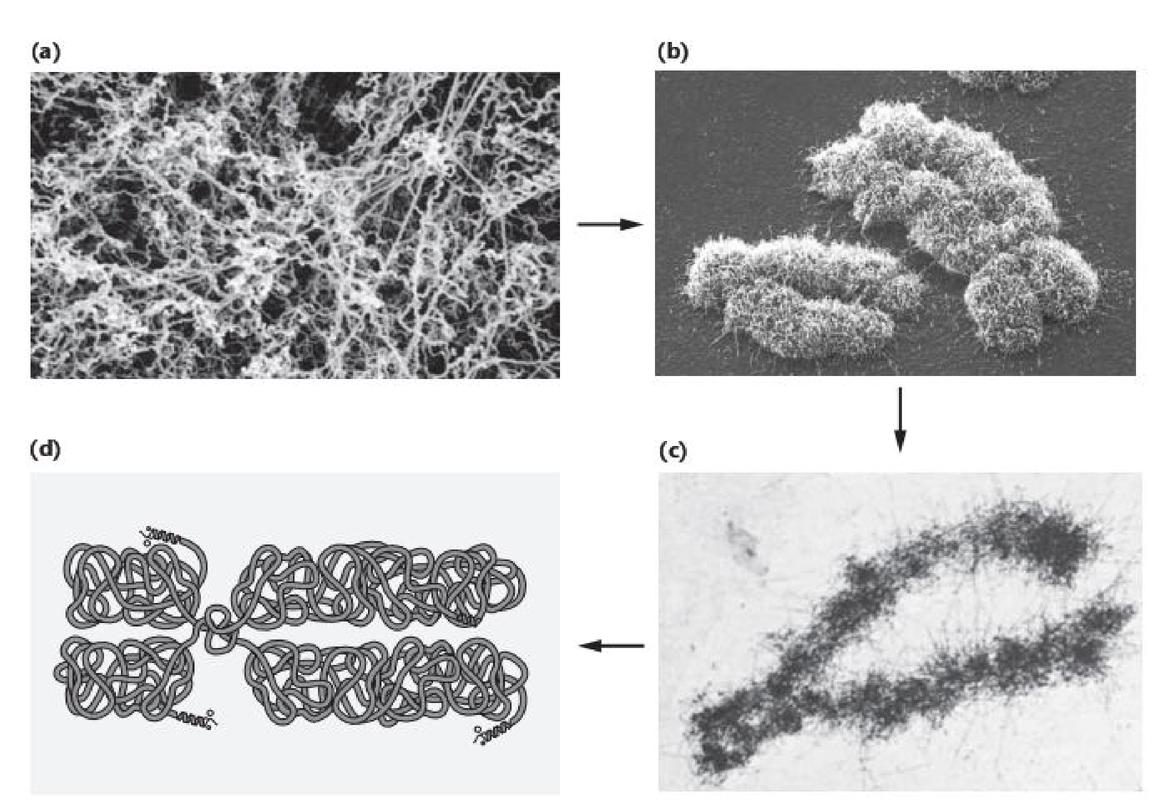


FIGURA 2.13 Comparación de (a) fibras de cromatina, características del núcleo en interfase, con (b) y (c) cromosomas metafásicos mitóticos formados a partir de la cromatina. La parte (d) esquematiza al cromosoma mitótico y sus distintas partes, mostrando como se condensa la cromatina para formarlo. Las partes (a) y (c) son micrografías electrónicas de transmisión, mientras que la parte (b) es una micrografía electrónica de barrido.

se curvan siempre hacia el interior. Obviamente, tales fibras están espiralizadas y replegadas entre sí, dando lugar al aspecto normal de los cromosomas mitóticos. Comenzando en la telofase tardía de la mitosis y continuando durante el periodo G1 de la interfase, los cromosomas se desenrollan para formar las largas fibras características de la cromatina, que constan en DNA asociado a proteínas, especialmente a las proteínas llamadas histonas. Es en esta disposición física en la que el DNA puede funcionar más eficazmente en la transcripción y replicación.

La observación de cromosomas mitóticos con el microscopio electrónico en diversos estados de espiralización condujo a Ernest DuPraw a postular el **modelo de fibra plegada**, que se presenta en la Figura 2.13(d). En la metafase, cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas, unidas por la región centromérica. Cada brazo de la cromátida parece que esta formado por una única fibra enrollada como el hilo de una madeja. La fibra densamente enrollada está formada por DNA de doble cadena y proteínas. Un ordenado proceso de espiralización, entrelazamiento y condensación parece estar implicado en la transición desde la cromatina interfásica hasta los cromosomas mitóticos, mas condensados. En la transición de interfase a profase, se estima que hay una contracción de unas 5.000 veces en cuanto a la longitud del DNA dentro de la fibra de cromatina! Este proceso tiene que ser extraordinariamente preciso, dada la apariencia tan ordenada y consistente de los cromosomas mitóticos de todos los eucariotas. Nótese en especial en las micrografías la distinción neta de las cromátidas hermanas que constituyen cada cromosoma. Están unidas sólo por un centrómero común que comparten desde antes de la anafase.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que los cromosomas mitóticos derivan de la cromatina interfásica?

El complejo sinaptinémico

El microscopio electrónico también ha servido para visualizar otro componente estructural de los cromosomas, que se observa sólo en las células en meiosis. Esta estructura, de la que hablamos al presentar la primera profase meiótica, se encuentra entre los homólogos en sinapsis y se denomina **complejo sinaptinémico**. En 1956, Montrose Moses observó este complejo en espermatocitos de cangrejo, y Don Fawcett lo vio en espermatocitos humanos y de paloma. Debido a que no había todavía una explicación satisfactoria del mecanismo de sinapsis o del entrecruzamiento y de la formación de los quiasmas, mu-

chos investigadores se interesaron por esta estructura. Con pocas excepciones, los estudios revelaron que el complejo sinaptinémico está presente en la mayoría de las células animales y vegetales, visualizándose en la meiosis.

Como se puede ver en la micrografía electrónica de la Figura 2.14(a), el complejo sinaptinémico es una estructura con tres partes. El elemento central es normalmente mas fino y menos denso (100-150 Å) que los dos elementos idénticos externos (500 Å). Las estructuras externas, denominadas elementos laterales, están íntimamente asociadas con los homólogos en sinapsis, a ambos lados. Una tinción selectiva revela que estos elementos laterales están formados principalmente por DNA y proteínas, sugiriendo que la cromatina es una parte esencial de los mismos. Algunas fibrillas de DNA atraviesan estos elementos laterales, estableciendo conexiones con el elemento central, que está compuesto principalmente por proteínas. En la Figura 2.14(b) se presenta una interpretación esquemática de la micrografía electrónica de acuerdo con la descripción anterior.

La formación del complejo se inicia antes del paquiteno. Ya en el leptoteno de la primera profase meiótica se observan elementos laterales asociados con cromátidas hermanas. Los homólogos, que aún no se han asociado, se encuentran dispersos aleatoriamente en el núcleo. Como vimos antes, en la siguiente subfase, el zigoteno, los cromosomas homólogos comienzan a alinearse en el llamado apareamiento preliminar, pero permanecen separados por unos 300 nm. Luego, en el paquiteno, se produce la asociación íntima entre los homólogos, característica de la sinapsis, y se completa la formación del complejo. En algunos organismos diploides esto ocurre a modo de una cremallera, comenzando por los extremos de los cromosomas, que pueden estar unidos a la cubierta nuclear.

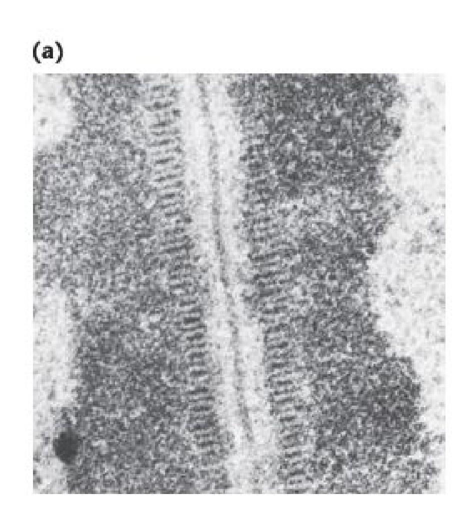
El complejo sinaptinémico es el vehículo para el apareamiento de los homólogos y para su posterior segregación en la meiosis.

Sin embargo, en ciertos casos puede haber cierto grado de sinapsis sin que se formen complejos sinaptinémicos. Por ello, es posible que la función de esta estructura pueda ir mas allá que su mera implicación en la formación de los bivalentes.

En ciertos casos en que no se forman los complejos sinaptinémicos en la meiosis, la sinapsis no es tan completa y el entrecruzamiento se reduce o se elimina. Por ejemplo, en los machos de *Drosophila melanogaster*, en donde normalmente no se observan complejos sinaptinémicos, el entrecruzamiento meiótico se da raramente, si es que se da. Esta observación sugiere que el complejo sinaptinémico puede ser importante para que se formen los quiasmas y ocurra el entrecruzamiento.

El estudio de la mutación *zip1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ha proporcionado nuevas ideas sobre el apareamiento de los cromosomas. Las células que tienen esta mutación pueden entrar en un estadio de alineamiento inicial (apareamiento preliminar) y formar elementos central y laterales completos, pero no consiguen el característico apareamiento íntimo de la sinapsis. Se ha sugerido que el producto génico del locus *zip1* es una proteína que forma parte del elemento central del complejo sinaptinémico, ya que no se encuentra en las células mutantes. Esta observación sugiere que un complejo sinaptinémico completo e intacto es esencial en la transición desde el estadio inicial de apareamiento preliminar hasta el característico apareamiento íntimo de la sinapsis.

(a)



(b)

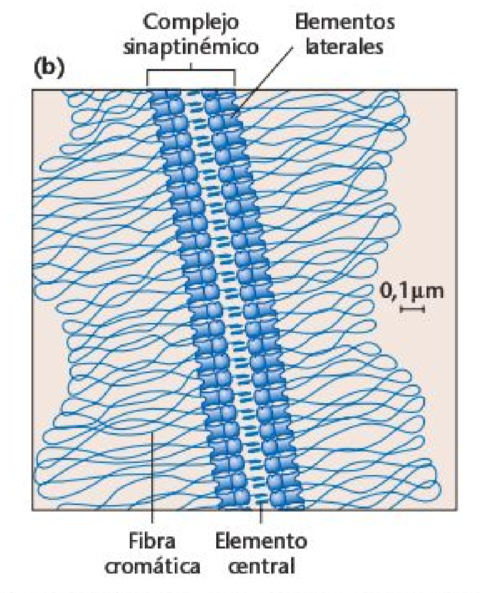


FIGURA 2.14 (a) Micrografía electrónica de parte de un complejo sinaptinémico que se encuentra entre bivalentes en sinapsis de *Neotiella rutilans.* (b) Interpretación esquemática de los componentes que constituyen el complejo sinaptinémico. Se señalan los elementos laterales, el elemento central y la fibra de cromatina. *D. von Wettstein/Annual Reviews, Inc.*/Con autorización de *«Annual Review of Genetics»*, volumen 6. © 1972 por Annual Reviews, Inc. www.AnnualReviews.org. Fotografía de D. Von Wettstein.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. La estructura de las células es elaborada y compleja. Hay muchos componentes celulares implicados directa o indirectamente en los procesos genéticos.
2. En los organismos diploides, los cromosomas se encuentran formando parejas homólogas. Cada miembro del par tiene el mismo tamaño, la misma situación del centrómero y los mismos genes en los mismos lugares. Uno de los miembros de cada pareja proviene del padre y el otro de la madre.
3. La mitosis y la meiosis son mecanismos mediante los cuales las células distribuyen la información genética, que se encuentra en los cromosomas, a sus descendientes de un modo preciso y ordenado.
4. La mitosis, o división nuclear, es parte del ciclo celular y es la base de la reproducción celular. Las células hijas que se producen son genéticamente idénticas a las células progenitoras.
5. La mitosis se subdivide en fases discretas: la profase, la prometafase, la metafase, la anafase y la telofase. La condensación de la cromatina en estructuras cromosómicas ocurre en la profase. En la prometafase los cromosomas adquieren la apariencia de estructuras dobles, representando cada una de ellas un par de cromátidas hermanas. En la metafase, los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial de la célula. En la anafase, las cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan y se dirigen hacia los polos opuestos. En la telofase se completa la formación de las células hijas y se caracteriza por la citocinesis, o división del citoplasma.
6. La meiosis, que es la base subyacente de la reproducción sexual, da lugar a la conversión de las células diploides en gametos o esporas haploides. Como consecuencia de la duplicación cromosómica y de dos divisiones consecutivas, cada célula haploide recibe uno de los miembros de cada pareja de cromosomas homólogos.
7. En los animales existe una diferencia importante entre las meiosis masculina y femenina. En la espermatogénesis el volumen citoplásmico se reparte por igual y se producen cuatro espermatozoides haploides. Sin embargo, en la oogénesis el citoplasma se acumula en una única célula, el óvulo, y se reduce en el otro grupo de células haploides, los corpúsculos polares. El citoplasma extra contribuye al desarrollo del zigoto, una vez se ha producido la fecundación.
8. La meiosis da lugar a una enorme variación genética como consecuencia del intercambio en el entrecruzamiento entre cromátidas maternas y paternas y por su segregación al azar a cada gameto. Además, la meiosis juega un papel importante en el ciclo biológico de hongos y vegetales, sirviendo de puente entre generaciones alternantes.
9. Los cromosomas mitóticos se forman por espiralización y condensación de fibras de cromatina, características de la interfase.

IDEAS Y SOLUCIONES

Con la primera aparición de «Ideas y soluciones», es apropiado dar una breve descripción de su importancia para los estudiantes. Esta sección precederá a la de «Problemas y preguntas a discusión» en cada capítulo y proporcionará problemas tipo y soluciones que ilustrarán enfoques útiles en el análisis genético. Las ideas que adquiera trabajando con esta sección le ayudaran a llegar a soluciones correctas de los problemas que siguen en cada capítulo.

1. En un organismo, con un número diploide igual a 6, ¿cuántas estructuras cromosómicas individuales se alinearán en la placa metafásica de (a) la mitosis, (b) la meiosis I; y (c) la meiosis II? Describa cada configuración.

Solución: (a) En la mitosis, en donde los cromosomas homólogos no sufren sinapsis, habrá 6 estructuras dobles, cada una con un par de cromátidas hermanas. El número de estructuras es equivalente al número diploide. (b) En la meiosis I, los homólogos están en sinapsis, reduciéndose el número de estructuras a 3. Cada una de ellas se denomina tétrada y consta de dos parejas de cromátidas hermanas. (c) En la meiosis II, hay el mismo número de estructuras (3), pero en este caso se denominan diadas. Cada una de ellas consta de un par de cromátidas hermanas. Si ha ocurrido entrecruzamiento, cada cromátida puede contener parte de una de sus cromátidas no hermanas, como consecuencia del intercambio en la profase I.

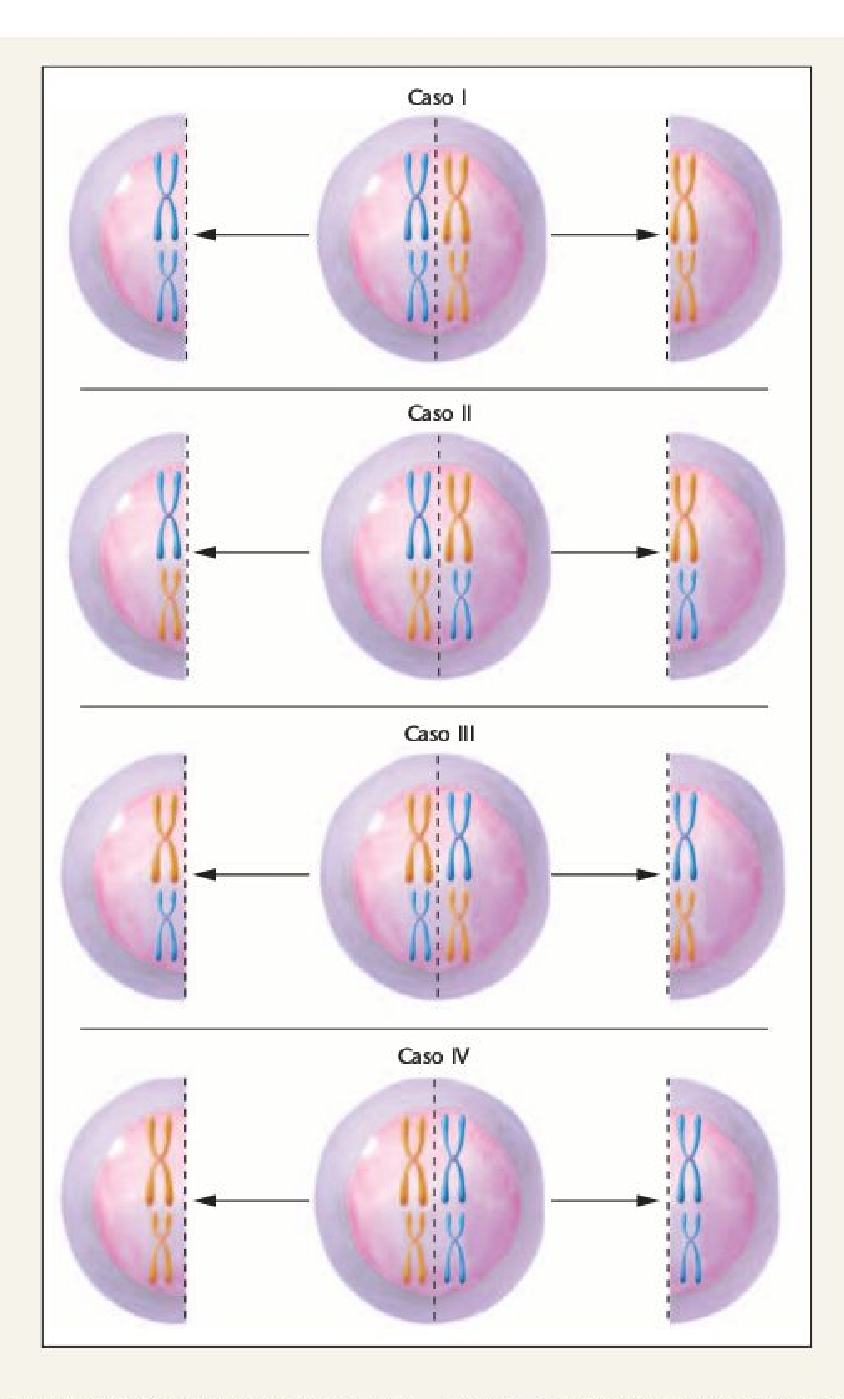
2. Considere dos pares de cromosomas metacéntricos, uno mas grande y otro mas pequeño. Dibuje todas las posibles configuraciones de alineamiento que pueden darse en la metafase de la meiosis I.

Solución: Como se muestra en el siguiente esquema, son posibles cuatro configuraciones cuando $n = 2$.

3. Para los genes y cromosomas del problema anterior, suponga que un gen se encuentra en los dos cromosomas grandes, con dos alelos, *A* y *a*, tal como se muestra. Suponga también un segundo gen con dos alelos (*B* y *b*) presente en los cromosomas mas pequeños. Calcule la probabilidad de generar cada una de las siguientes combinaciones génicas (*AB*, *Ab*, *aB*, *ab*) después de la meiosis I.

Solución:

Caso I	*AB* y *ab*	
Caso II	*Ab* y *aB*	
Caso III	*aB* y *Ab*	
Caso IV	*ab* y *AB*	
Total:	$AB = 2$	$(p = 1/4)$
	$Ab = 2$	$(p = 1/4)$
	$aB = 2$	$(p = 1/4)$
	$ab = 2$	$(p = 1/4)$

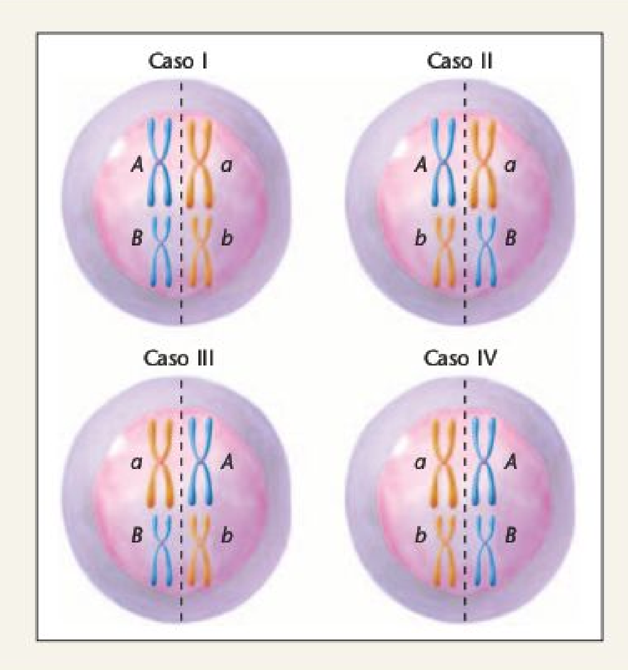


4. ¿Cuántas configuraciones cromosómicas diferentes pueden darse después de la meiosis I si hay tres parejas de cromosomas diferentes ($n = 3$)?

Solución: Si $n = 3$, entonces serán posibles ocho configuraciones diferentes. La fórmula 2^n, en donde n indica al número haploide, permite calcular el número de patrones de alineamiento potenciales. Como veremos en el capítulo siguiente, estos patrones se producen como consecuencia del principio mendeliano de la segregación y sirven de base física para el principio mendeliano de la transmisión independiente.

5. Describa la composición de una tétrada, tal como se daría en la profase I de la meiosis, suponiendo que no ha habido entrecruzamiento. ¿Qué consecuencias tendría un entrecruzamiento en dicha estructura?

Solución: Tal tétrada contendría cuatro cromátidas, formando dos parejas. Los miembros de cada par son réplicas del otro miembro y se denominan cromátidas hermanas. Se mantienen unidas por un centrómero común. Los miembros de un par provienen de la madre mientras que los miembros del otro par provienen del padre. Los miembros paternos y maternos se denominan cromátidas no hermanas. Un entrecruzamiento dará lugar al intercambio de una porción de cromátida paterna y materna, produciendo un quiasma, en donde las dos cromátidas implicadas se solapan físicamente en la tétrada. El proceso de intercambio se denomina entrecruzamiento.



PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Explique el papel que juegan los siguientes componentes celulares en el almacenamiento, expresión o transmisión de la información genética: (a) cromatina, (b) nucleolo, (c) ribosoma, (d) mitocondria, (e) centriolo, (f) centrómero.
2. Discuta los conceptos de cromosomas homólogos, diploidía y haploidía. ¿Qué características comparten dos cromosomas considerados homólogos?
3. Si dos cromosomas de una especie tienen la misma longitud y el centrómero se sitúa aproximadamente en el mismo sitio, pero no son homólogos, ¿qué es lo que les diferencia?
4. Describa los hechos que caracterizan cada fase de la mitosis.
5. Si un organismo tiene un número diploide igual a 16, ¿cuántas cromátidas serán visibles al final de la profase de la mitosis? ¿Cuántos cromosomas se desplazarán a cada polo en la anafase de la mitosis?
6. Indique el nombre de los cromosomas teniendo en cuenta la situación del centrómero.
7. Compare la telofase de la mitosis en vegetales y en animales.
8. Describa las fases del ciclo celular y los sucesos que las caracterizan.
9. Un organismo tiene un número diploide igual a 16 en el oocito primario. (a) ¿Cuántas tétradas habrá en la primera profase meiótica? (b) ¿Cuántas diadas en la segunda profase meiótica? (c) ¿Cuántas mónadas migrarán a cada polo en la segunda anafase meiótica?
10. Compare el resultado final de la meiosis con el de la mitosis.
11. Defina y discuta los siguientes términos: (a) sinapsis, (b) bivalentes, (c) quiasmas, (d) entrecruzamiento, (e) cromómeros, (f) cromátidas hermanas, (g) tétradas, (h) diadas, y (i) mónadas.
12. Compare el contenido genético y el origen de las cromátidas hermanas respecto de las cromátidas no hermanas en su primera aparición en la profase I de la meiosis. ¿Cómo podría cambiar el contenido genético de éstas antes de que las tétradas se alineen en la placa ecuatorial de la metafase I?
13. Dados los resultados finales de los dos tipos de división, ¿por qué es necesario para los homólogos emparejarse en la meiosis y no es deseable que se emparejen en la mitosis?
14. Examine la Figura 2.11, que muestra la oogénesis en células animales. El genotipo del segundo corpúsculo polar (derivado de la meiosis II) ¿será siempre idéntico al de la ootida? ¿Por qué si o por qué no?
15. Compare la espermatogénesis y la oogénesis. ¿Cuál es el significado de la formación de los corpúsculos polares?
16. Explique porqué la meiosis da lugar a una gran variación genética mientras que la mitosis no.
17. Una célula diploide tiene tres pares de cromosomas homólogos, denominados C1 y C2, M1 y M2 y S1 y S2. No hay entrecruzamiento. ¿Qué posibles combinaciones de cromosomas habrá en (a) células hijas después de la mitosis? ¿(b) la primera metafase meiótica? ¿(c) células haploides después de las dos divisiones meióticas?
18. Considerando el problema anterior, prediga el número de células haploides diferentes que se darán si se considera una cuarta pareja de cromosomas (W1 y W2) además de los cromosomas C, M y S.
19. En la oogénesis de una especie animal, con un número haploide igual a 6, una diada sufre una no disyunción en la meiosis II. Después de la segunda división meiótica, la diada en cuestión va a parar intacta al óvulo. ¿Cuántos cromosomas hay en (a) el óvulo

maduro y (b) en el segundo corpúsculo polar? (c) Después de la fecundación por un espermatozoide normal, ¿qué situación cromosómica se origina?

20. ¿Cuál es la probabilidad de que en un organismo, con un número haploide igual a 10, se forme un espermatozoide que tenga los 10 cromosomas cuyos centrómeros provengan de los homólogos maternos?

21. En la primera profase meiótica, (a) ¿cuándo se produce el entrecruzamiento? (b) ¿Cuándo se produce la sinapsis? (c) ¿En qué fase están los cromosomas menos condensados? (d) ¿Cuándo se hacen visibles los quiasmas?

22. Describa el papel de la meiosis en el ciclo biológico de una planta superior.

23. Compare la fibra de cromatina con un cromosoma mitótico. ¿Cómo se relacionan estas dos estructuras?

24. Describa el modelo de «fibra plegada» de los cromosomas mitóticos.

25. Se le proporciona una preparación de cromosomas metafásicos de un organismo desconocido que tiene 12 cromosomas. Dos son claramente mas pequeños que el resto, siendo idénticos en longitud y situación del centrómero. Describa todo lo que pueda acerca de estos cromosomas.



Problemas extra-picantes

Como parte de la sección «Problemas y preguntas a discusión», presentaremos, en este y en los siguientes capítulos, uno o mas problemas «extra-picantes». Hemos preferido situar estos problemas aparte a fin de subrayar aquellos especialmente desafiantes. Se le puede pedir que los examine y que valore datos reales, para diseñar experimentos genéticos o para entregarse a un aprendizaje cooperativo. Como las variedades genéticas de pimientos, algunas de estas experiencias picarán un poco y otras lo harán mucho. Esperemos que todos ellos dejen un agradable sabor en aquellos que se den el gusto de resolverlos.

Para las preguntas 26-31 de la derecha, considere una célula diploide con tres pares de cromosomas, AA, BB y CC. Cada pareja tiene un miembro paterno y otro materno (p.e., A^p y A^m). Utilizando esta nomenclatura, demuestre su comprensión de la mitosis y de la meiosis dibujando las combinaciones de cromátidas que se le piden. Asegúrese en indicar si las cromátidas están emparejadas como consecuencia de la replicación y/o de la sinapsis. Puede que desee usar un gran trozo de papel manila marrón para envolver o una bolsa de papel, y trabajar con un compañero cuando trate de solucionar estos problemas. Tal aprendizaje cooperativo puede ser un enfoque útil para resolver problemas a lo largo del texto.

26. ¿Qué combinación o combinaciones de cromátidas aparecerán en la metafase de la mitosis? ¿Qué combinación o combinaciones aparecerán en cada polo al final de la anafase?

27. En la meiosis I, suponiendo que no hay entrecruzamiento, ¿qué combinación o combinaciones de cromátidas habrá al final de la profase? Dibuje todos los posibles alineamientos de cromátidas cuando comienza la migración al principio de la anafase.

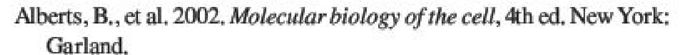
28. ¿Hay algunas combinaciones posibles en la profase de la meiosis II distintas de las que dibujó en el problema 27? Si es así, dibújelas. Si no, siga con el problema 29.

29. Dibuje todas las posibles combinaciones de cromátidas al comienzo de la anafase en la meiosis II.

30. Suponga que en la meiosis I ninguno de los cromosomas *C* se ha separado en metafase, pero se han separado en la meiosis II, dando lugar a diadas (en lugar de a mónadas) ¿Cómo afectarían estos cambios en las anafases de la Meiosis I y II en los alineamientos que está construyendo? Dibújelos.

31. Suponga que cada gameto que se produce en el problema 30 participa en la fecundación de un gameto haploide normal. ¿Qué combinaciones aparecerán? ¿Qué porcentaje de zigotos será diploide, con un miembro paterno y otro materno de cada pareja cromosómica?

LECTURAS SELECCIONADAS



Alberts, B., et al. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York: Garland.

Brachet, J., and Mirsky, A.E. 1961. *The cell: Meiosis and mitosis*, Vol. 3. Orlando, FL: Academic Press.

DuPraw, E.J. 1970. *DNA and chromosomes*. New York: Holt, Rinehart & Winston.

Glover, D.M., Gonzalez, C., and Raff, J.W. 1993. The centrosome. *Sci. Am.* (June) 268:62-68.

Golomb, H.M., and Bahr, G.F. 1971. Scanning electron microscopic observations of surface structures of isolated human chromosomes. *Science* 171:1024-26.

Hartwell, L.H., and Karstan, M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-28.

Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. 1989. Checkpoint controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-34.

Mazia, D. 1961. How cells divide. *Sci. Am.* (Jan.) 205:101-20.

———. 1974. The cell cycle. *Sci. Am.* (Jan.) 235:54-64.

McIntosh, J.R., and McDonald, K.L. 1989. The mitotic spindle. *Sci. Am.* (Oct.) 261:48-56.

Westergaard, M., and von Wettstein, D. 1972. The synaptinemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 6:71-110.

Genética mendeliana



Gregor Johann Mendel, que en 1866 desarrolló los principales postulados de la genética de la transmisión con sus experimentos en guisantes de jardín.

Conceptos del capítulo

- La herencia depende de la información almacenada en unos factores discretos llamados genes.
- Los genes se transmiten de generación en generación a través de unos vehículos llamados cromosomas.
- Los cromosomas, que forman parejas, proporcionan la base de la herencia biparental.
- En la formación de los gametos, los cromosomas se distribuyen de acuerdo con los postulados descritos por primera vez por Gregor Mendel en el siglo XIX, basándose en sus investigaciones con el guisante de jardín.
- Los postulados mendelianos indican que los cromosomas homólogos se segregan uno de otro y se asocian independientemente con otros homólogos segregantes en la formación de los gametos.
- Las proporciones genéticas, expresadas como probabilidades, están sujetas a desviaciones al azar y se pueden evaluar estadísticamente.

Aunque la herencia de los caracteres biológicos se ha reconocido hace miles de años, la primera idea importante sobre el mecanismo implicado se dio hace casi 140 años. En 1866, Gregor Johann Mendel, publicó los resultados de una serie de experimentos que sentaron las bases de la genética como disciplina formal. Aunque el trabajo de Mendel pasó largo tiempo inadvertido hasta 1900, después del redescubrimiento del mismo, se estableció el concepto de gen como unidad hereditaria discreta. Se clarificó el modo en el que los genes, como miembros de los cromosomas, se transmiten a los descendientes y controlan los caracteres. La investigación ha continuado sin pausa durante el siglo XX. Realmente, los estudios en genética, y más recientemente aquellos que se refieren al ámbito molecular, han permanecido en la frontera de la investigación biológica desde principios del siglo XX.

Cuando Mendel comenzó sus estudios sobre la herencia utilizando *Pisum sativum*, el guisante de jardín, no se sabía de la existencia de los cromosomas ni del papel y mecanismo de la meiosis. No obstante, Mendel pudo determinar la existencia de **unidades de herencia** discretas y predecir su comportamiento durante la formación de los gametos. Investigadores posteriores, con acceso a datos citológicos, pudieron relacionar sus observaciones sobre el comportamiento de los cromosomas en la meiosis con los principios de la herencia de Mendel. Una vez que se estableció esta correlación, los postulados de Mendel se aceptaron como la base para el estudio de lo que se conoce como la **genética mendeliana** o **de la transmisión**. Estos principios describen de qué manera se transmiten los genes de padres a hijos y derivan directamente de los experimentos de Mendel. Incluso hoy día constituyen la piedra angular de los estudios sobre la herencia. En este capítulo nos centraremos en el desarrollo de los principios de Mendel.

3.1 Mendel utilizó un modelo experimental para abordar el estudio de los patrones de herencia

Johann Mendel nació en 1822 en una familia campesina en el pueblo centroeuropeo de Heinzendorf. Excelente estudiante en la escuela superior, Mendel estudió filosofía durante varios años y fue admitido en 1843 en el monasterio agustino de Santo Tomas, de Brno, que ahora forma parte de la República Checa. Como monje tomó el nombre de Gregor. En 1849 fue relevado de sus obligaciones pastorales y designado para un puesto de enseñanza que ocupó durante varios años. De 1851 a 1853 asistió a la Universidad de Viena, en donde estudió física y botánica. En 1854 volvió a Brno en donde, durante los 16 años siguientes, enseñó física y ciencias naturales. Mendel recibió apoyo del monasterio para sus estudios e investigaciones a lo largo de su vida.

Seminario Web 3.1
Cruces monohíbridos y cuadrado de Punnet

En 1856 Mendel realizó su primera serie de experimentos de hibridación con el guisante de jardín. La fase investigadora de su carrera duró hasta 1868, cuando fue elegido Abad del monasterio. Aunque su interés por la genética se mantuvo, sus nuevas responsabilidades ocuparon todo su tiempo. En 1884 Mendel murió de una enfermedad renal. El periódico local le rindió el siguiente tributo: «Su muerte ha privado a los pobres de un benefactor y a la humanidad de un gran hombre de noble carácter, que fue cálido amigo, promotor de las ciencias naturales y sacerdote ejemplar».

En 1865 Mendel publicó los resultados de algunos cruces genéticos sencillos realizados entre ciertas variedades de guisante. Aunque no fue el primero que intentó obtener pruebas experimentales de la herencia, el éxito de Mendel, en donde otros habían fallado, se puede atribuir, al menos en parte, a su elegante modelo de diseño experimental y analítico.

Mendel demostró una gran perspicacia en la metodología necesaria para una buena biología experimental. En primer lugar eligió un organismo fácil de cultivar, que podía hibridarse manualmente. En la naturaleza el guisante se autofecunda, pero es experimentalmente fácil realizar fecundaciones cruzadas. Se reproduce bien y crece hasta adulto en una sola estación. Luego Mendel, para seguir, eligió siete caracteres visibles (caracteres unidad), cada uno de los cuales estaba representado por dos formas o caracteres alternativos (Figura 3.1). Por ejemplo, para el carácter altura del tallo, experimentó con plantas *altas* y *enanas*. Seleccionó otros seis pares de caracteres alternativos que afectaban a la forma y al color de la semilla, a la forma y color de las vainas y al color y situación de las flores. Dispuso de variedades puras de los comerciantes de semillas locales, en las que cada carácter permanece invariable generación tras generación al autofecundarse las plantas

Además de la elección del organismo adecuado, varios factores condujeron al éxito de Mendel. Limitó su análisis a uno o muy pocos pares de caracteres alternativos en cada experimento. Tuvo mucho cuidado en registrar los datos cuantitativamente, algo necesario en experimentos genéticos. Del análisis de sus datos, Mendel dedujo ciertos postulados que se han convertido en los principios de la genética de la transmisión.

Los resultados de los experimentos de Mendel no fueron apreciados hasta comienzos del siglo XX, bastante después de su muerte. Una vez redescubiertas las publicaciones de Mendel por genéticos que investigaban la función y el comportamiento de los cromosomas, las implicaciones de sus postulados fueron inmediatamente claras. Había descubierto las bases de la transmisión de los caracteres hereditarios!

3.2 El cruce monohíbrido revela cómo se transmite un carácter de generación en generación

El cruce más sencillo realizado por Mendel implicaba sólo a un par de caracteres alternativos. Cada uno de tales experimentos

Carácter	Caracteres alternativos	Resultados en F_1	Resultados en F_2	Proporción en F_2
Semillas	redondo/rugoso	todas redondas	5.474 redondas 1.850 rugosas	2,96:1
	amarillo/verde	todas amarillas	6.022 amarillas 2.001 verdes	3,01:1
Vainas	Hinchado/arrugado	todas hinchadas	882 hinchadas 299 arrugadas	2,95:1
	verde/amarillo	todas verdes	428 verdes 152 amarillas	2,82:1
Color de la flor	violeta/blanco	todas violeta	705 violetas 224 blancas	3,15:1
Posición de la flor	axial/terminal	todas axiales	651 axiales 207 terminales	3,14:1
Longitud del tallo	alto/enano	todos altos	787 altos 277 enanos	2.84:1

FIGURA 3.1 Resumen de los siete pares de caracteres alternativos y de los resultados de los siete cruces monohíbridos de Mendel en el guisante de jardín (*Pisum sativum*). En cada caso, se utilizó el polen proveniente de plantas que manifestaban uno de los caracteres para fecundar al óvulo de plantas que manifestaban el otro carácter. En la generación F_1, todas las plantas manifestaban uno de los dos caracteres (el dominante). El carácter alternativo (recesivo), reaparecía luego, aproximadamente en la cuarta parte de las plantas F_2[1].

se denomina **cruce monohíbrido**. Un cruce monohíbrido se realiza cruzando individuos de dos variedades paternas, cada una de las cuales presenta una de las dos formas alternativas del carácter en estudio. Inicialmente examinaremos la primera generación de descendientes de tal cruce y luego consideraremos los descendientes de individuos **autofecundados** de esta primera generación. A los padres se les llama $\mathbf{P_1}$ o **generación paterna**, sus descendientes son la $\mathbf{F_1}$ o **primera generación filial** y los individuos resultantes de la autofecundación de la F_1 son la $\mathbf{F_2}$ o **segunda generación filial**.

El cruce entre guisantes de variedades puras con tallos altos y con tallos enanos es representativo de los cruces monohíbridos de Mendel. *Alto* y *enano* son formas o caracteres alternativos del carácter estatura del tallo. A menos que las plantas altas o enanas se crucen entre sí o con otra variedad, se autofecundarán y mantendrán su pureza, transmitiendo su característica generación tras generación. Sin embargo, cuando Mendel cruzó plantas altas con plantas enanas, el resultado de la F_1 fue sólo de plantas altas. Cuando dejó que se autofecundaran los miembros de F_1, Mendel observó que 787 de las 1.064 plantas de la F_2 eran altas y que 277 eran enanas. Advierta que en este cruce (Figura 3.1) el carácter enano desaparece en F_1, sólo para reaparecer en la generación F_2. Mendel hizo cruces similares entre plantas de guisante que manifestaban cada uno de los otros pares de caracteres alternativos. Los resultados de estos cruces también se presentan en la Figura 3.1. En todos los casos, el resultado fue similar al del cruce alto/enano.

Los datos genéticos normalmente se expresan y se analizan como proporciones. En este ejemplo concreto se realizaron muchos cruces P_1 idénticos y se obtuvieron muchas plantas F_1

[1] *Nota del traductor:* en el caso de la forma o del color de las semillas (y de las vainas), lo que aparece en F_2 es una cuarta parte de estas semillas (o vainas) manifestando el carácter recesivo, y no las plantas, que tendrían tanto semillas amarillas como semillas verdes. Es decir, una vez se han obtenido las plantas de F_1, que son heterozigotas, la autofecundación de esas plantas dará lugar a la aparición, en las mismas, de vainas con semillas amarillas y semillas verdes en la proporción 3:1. Cada semilla es el resultado de la autofecundación de gametos con el alelo para verde, o para amarillo, de acuerdo con la segregación mendeliana, con lo que se producirán 3/4 de semillas amarillas V- y 1/4 de semillas verdes vv.

—todas altas. De los 1.064 descendientes de la F_2, 787 eran altos y 277 enanos, una proporción aproximadamente de 2,8:1,0, o alrededor de 3:1. Las tres cuartas partes se parecían a las plantas de F_1, mientras que una cuarta parte manifestaba el carácter alternativo que había desaparecido en F_1.

Es importante señalar otro aspecto de los cruces monohíbridos. En cada cruce, los patrones de herencia de F_1 y de F_2 fueron similares, independientemente de qué planta P_1 hubiera sido el origen del polen (esperma), y de cual hubiera sido el origen del óvulo. Los cruces pudieron realizarse en cualquier sentido —es decir, polen de la planta alta polinizando a plantas enanas, o viceversa. Estos se denominan **cruces recíprocos**. Por ello, los resultados de los cruces monohíbridos de Mendel no dependían del sexo.

Para explicar estos resultados, Mendel propuso la existencia de **factores discretos** para cada carácter. Sugirió que estos factores eran las unidades básicas de la herencia y pasaban sin cambio de generación en generación, determinando los distintos caracteres que expresaba cada planta. Utilizando estas ideas básicas, Mendel emitió hipótesis precisas de cómo tales factores podían explicar los resultados de los cruces monohíbridos.

Los tres primeros principios de Mendel

Teniendo en cuenta los consistentes patrones de los resultados de los cruces monohíbridos, Mendel dedujo los siguientes tres *postulados* o principios de la herencia.

1. FACTORES EN PAREJAS
Los caracteres genéticos están controlados por factores que se encuentran a pares en cada organismo.
En el cruce monohíbrido entre plantas altas y enanas, cada carácter tiene un factor específico. Cada individuo diploide recibe un factor de cada padre. Debido a que los factores están a pares, son posibles tres combinaciones: dos factores para altura normal, dos factores para enanismo, o un factor de cada tipo. Cada individuo posee una de estas tres combinaciones, lo que determina la altura del tallo.

2. DOMINANCIA/RECESIVIDAD
Cuando dos factores distintos, responsables de un carácter dado, se encuentran en un individuo, uno de los factores domina sobre el otro, que se denomina recesivo.
En cada cruce monohíbrido, el carácter que se expresa en la generación F_1 es consecuencia de la presencia del factor dominante. El carácter que no se expresa en F_1, pero que reaparece en F_2, se encuentra bajo la influencia genética del factor recesivo. Advierta que esta relación de dominancia/recesividad solo se manifiesta cuando se encuentran juntos en el mismo individuo factores diferentes. Los términos **dominante** y **recesivo** también se utilizan para designar a los caracteres. En el caso anterior, el carácter tallo alto es dominante y el carácter tallo enano es recesivo.

3. SEGREGACIÓN
En la formación de los gametos, los factores emparejados se separan o segregan al azar, de tal manera que cada gameto recibe uno u otro con igual probabilidad.
Este postulado proporciona una explicación adecuada de los resultados de los cruces monohíbridos. Utilicemos el cruce alto/enano para ilustrarlo. Mendel razonó que las plantas altas P_1 tenían un par de factores idénticos, como también lo tenían las plantas enanas P_1. Todos los gametos de las plantas altas recibían un factor alto como consecuencia de la segregación. De la misma manera, todos los gametos de las plantas enanas recibían un factor enano. Una vez fecundadas, todas las plantas F_1 recibían un factor de cada padre, un factor alto de uno y un factor enano del otro, restableciéndose el par. Debido a que alto es dominante sobre enano, todas las plantas F_1 eran altas.
Cuando las plantas F_1 forman gametos, el principio de la segregación exige que cada gameto reciba, al azar, *bien* el factor alto, *bien* el enano. Una vez se ha producido la fecundación al azar en la autofecundación de F_1, se formarán cuatro combinaciones en F_2 con igual frecuencia:

(1) alto/alto
(2) alto/enano
(3) enano/alto
(4) enano/enano

Las combinaciones 1 y 4 darán lugar claramente a plantas altas y enanas, respectivamente. De acuerdo con el principio de la dominancia/recesividad, las combinaciones 2 y 3 producirán plantas altas. Por consiguiente, se predice que la F_2 consta de tres cuartos de plantas altas y un cuarto de plantas enanas, una proporción 3:1. Esto es aproximadamente lo que Mendel observó en los cruces entre plantas altas y enanas. Un patrón similar se observó en cada uno de los otros cruces monohíbridos (Figura 3.1).

¿CÓMO LO SABEMOS?

- ¿Qué resultados experimentales condujeron a Mendel a postular que los factores que controlan la herencia de los caracteres se encuentran a pares?
- ¿Qué observaciones condujeron a Mendel a proponer que los factores se comportan como dominantes o como recesivos?
- ¿Cuáles fueron las observaciones críticas que condujeron a Mendel a proponer que los factores se segregan en la formación de los gametos?

Terminología genética actual

Para ilustrar el cruce monohíbrido y los tres primeros principios de Mendel en un contexto actual, tenemos que introducir varios términos nuevos así como una serie de símbolos para los

factores. Caracteres tales como alto o enano son expresiones visibles de la información que tienen los factores. Ahora denominamos a la apariencia física de un carácter el **fenotipo** del individuo.

Todos los factores de Mendel son unidades de herencia denominados **genes** por los genéticos actuales. Para cualquier carácter dado, como la altura de la planta, el fenotipo viene determinado por la presencia de combinaciones diferentes de formas alternativas de un solo gen llamadas **alelos**. Por ejemplo, los factores que condicionan alto y enano son alelos que determinan la altura de la planta de guisante.

Los genéticos utilizan distintas convenciones para asignar símbolos a los genes. En el Capítulo 4 revisaremos algunos de estos, pero por ahora adoptaremos uno que podamos utilizar adecuadamente a lo largo de este capítulo. Por convención se puede tomar la primera letra del carácter recesivo para simbolizar el carácter en cuestión. La letra minúscula designa al alelo del carácter recesivo y la letra mayúscula designa al alelo del carácter dominante. Estos símbolos también se escriben en cursiva. Por consiguiente, tomamos la *e* para designar al alelo enano, y la *E* para representar al alelo alto. Cuando se escriben los alelos en pareja para representar a los dos factores presentes en cualquier individuo (*EE*, *Ee* o *ee*) estos símbolos se refieren al **genotipo**. Este término refleja la constitución genética de un individuo, ya sea haploide o diploide. Siguiendo el principio de dominancia y recesividad, podemos saber el fenotipo de un individuo a partir de su genotipo: *EE* y *Ee* son altos y *ee* es enano. Cuando el genotipo está constituido por dos alelos idénticos (*EE* o *ee*) se dice que el individuo es **homozigoto**; cuando los alelos son diferentes (*Ee*), utilizamos el término **heterozigoto**. La Figura 3.2 ilustra el cruce monohíbrido completo, utilizando la terminología actual.

Ahora resuelva esto

El Problema 3.6 de la página 68 se refiere a un cruce mendeliano en donde se debe determinar el modo de herencia y los genotipos de los padres en una serie de casos.

Sugerencia: El primer paso es determinar cuántos genes hay implicados. Para resolverlo, convierta los datos a proporciones que son características de los cruces de Mendel. En este problema, pregúntese primero si alguna de las proporciones de F_2 se iguala a la proporción monohíbrida 3:1 de Mendel.

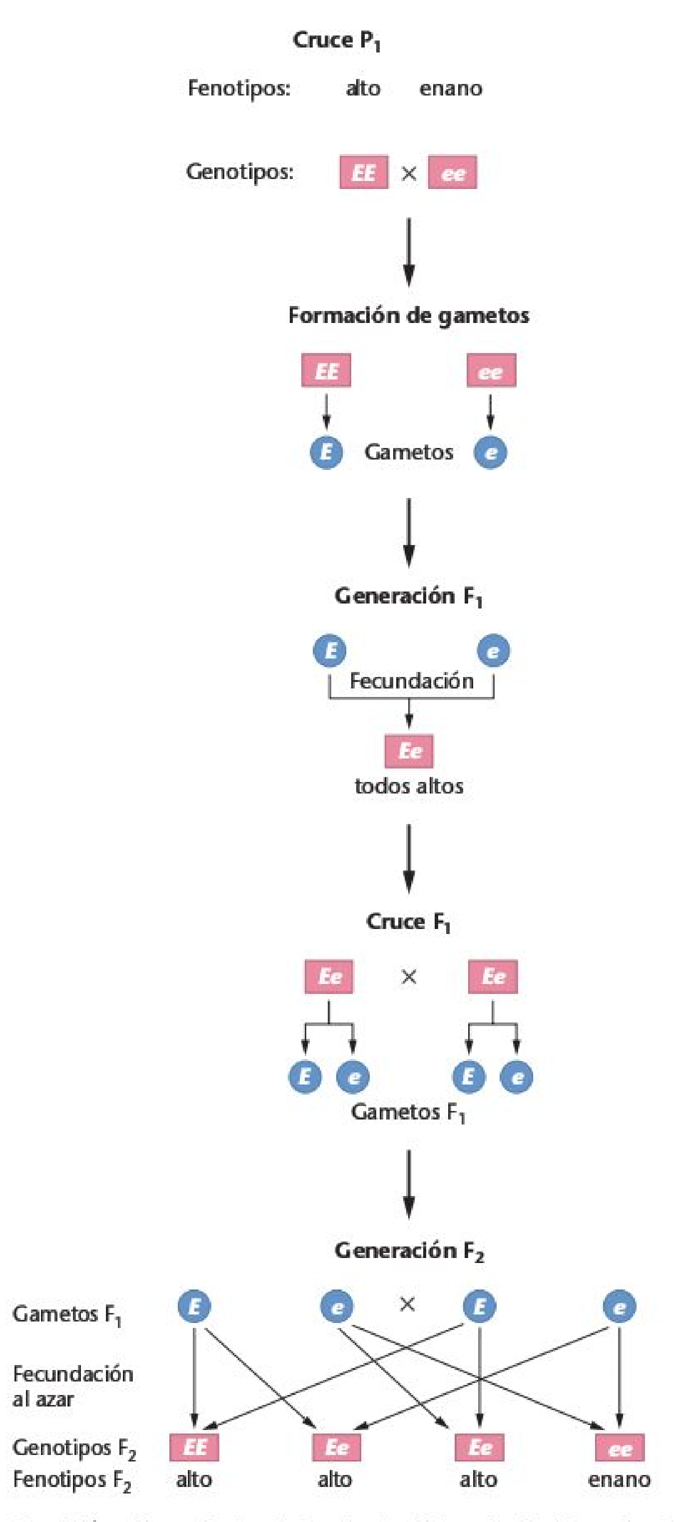


FIGURA 3.2 El cruce monohíbrido entre plantas de guisante altas y enanas. Los símbolos *E* y *e* se utilizan para designar a los factores alto y enano, respectivamente, en los genotipos de las plantas adultas y de los gametos. Todos los individuos se muestran dentro de un rectángulo, y los gametos dentro de un círculo.

Planteamiento analítico de Mendel

¿Qué le indujo a Mendel a deducir la existencia de factores a pares? Ya que había dos rasgos alternativos para cada carácter, parecía lógico que debieran existir dos factores distintos. Sin embargo, ¿por qué uno de los rasgos o fenotipos desaparece en F_1? La observación de F_2 ayuda a responder esta pregunta. El

carácter recesivo y su factor no desaparecen realmente en F_1; simplemente están escondidos o enmascarados, solo hasta reaparecer en la cuarta parte de los descendientes de F_2. Por consiguiente Mendel concluyó que cada uno de los individuos F_1 recibía un factor para alto y otro para enano; pero debido a que el factor, o alelo, alto, es dominante sobre el factor, o alelo, enano, todas las plantas F_1 son altas. Dada esta información, podemos preguntarnos cómo explicó Mendel la proporción 3:1 en F_2. Como se muestra en la Figura 3.2, Mendel dedujo que los alelos alto y enano de los heterozigotos de F_1 segregan al azar en los gametos. Si la fecundación es al azar, se predice esta proporción. Si se produce un gran número de descendientes el resultado de tal cruce reflejará la proporción 3:1.

Debido a que Mendel trabajaba sin los conocimientos previos de los que disfrutan hoy día los científicos, su razonamiento analítico debe considerarse un logro científico realmente destacado. Con la base de experimentos de cruce bastante simples, pero realizados cuidadosamente, no solo propuso la existencia de **unidades discretas de la herencia** sino que también explicó de qué manera se transmiten de una generación a la siguiente!

Tablero de Punnett

Los genotipos y fenotipos que resultan de la combinación de los gametos en la fecundación pueden visualizarse fácilmente construyendo un **tablero de Punnett**, así llamado por la primera persona que lo ideó, Reginald C. Punnett. En la Figura 3.3 se presenta este método de análisis para el cruce monohíbrido $F_1 \times F_1$. Cada uno de los posibles gametos se sitúa en una columna o en una fila, representando las columnas a los de la madre y las filas a los del padre. Después de situar los gametos en filas y columnas, podemos predecir la nueva generación combinando la información gamética masculina y femenina para cada combinación y situando los genotipos resultantes en los cuadros. Este proceso presenta todos los posibles sucesos de fecundación al azar. Los genotipos y fenotipos de todos los posibles descendientes se determinan leyendo las anotaciones de los cuadros.

El método del tablero de Punnett es particularmente útil cuando se comienza a aprender genética y para resolver problemas. Advierta lo fácil que es deducir las proporciones fenotípica 3:1 y genotípica 1:2:1 en la generación F_2 de la Figura 3.3.

El cruce prueba: un carácter

Se predice que las plantas altas que se producen en F_2 presentarán los genotipos *EE* o *Ee*. ¿Hay algún modo de averiguar el genotipo de una planta que expresa el fenotipo dominante? Mendel diseñó un método bastante simple que todavía se utiliza en experiencias de cruce de animales y vegetales: el **cruce prueba**. El organismo de fenotipo dominante, pero de genotipo desconocido, se cruza con un **individuo homozigoto recesivo**. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3.4(a), si una planta alta de genotipo *EE* se cruza con una planta enana, que tiene que tener el genotipo *ee*, todos los descendientes serán fenotípicamente altos y genotípicamente *Ee*. Sin embargo, como se muestra en la Figura 3.4(b), si una planta alta es *Ee* y se cruza con una planta enana (*ee*), entonces la mitad de los descen-

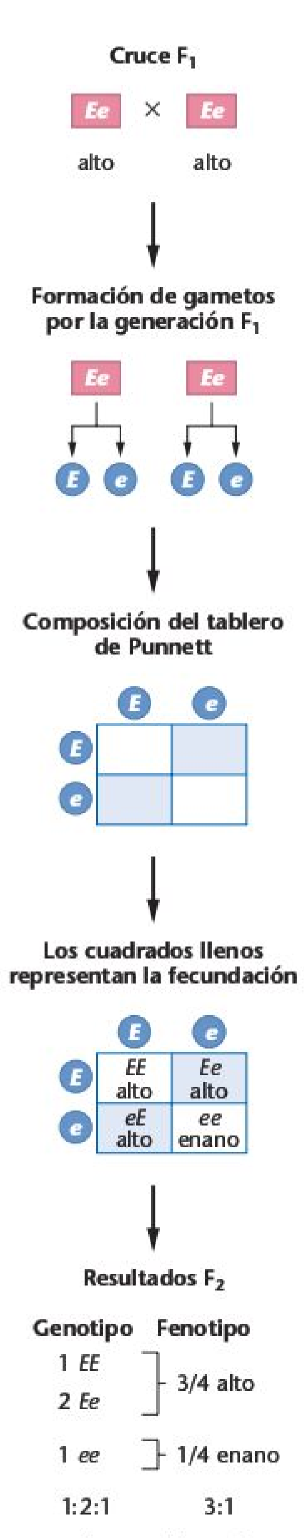


FIGURA 3.3 Utilización de un tablero de Punnett para generar las proporciones F_2 del cruces $F_1 \times F_1$ que se muestra en la Figura 3.2.

Resultados del cruce prueba

(a)
EE × *ee*
Homozigotos altos — Homozigotos enanos
E — *e*
Ee
todos altos

(b)
Ee × *ee*
Heterozigotos altos — Homozigotos enanos
E *e* — *e*
Ee — *ee*
1/2 altos — 1/2 enanos

FIGURA 3.4 Cruce prueba para un solo carácter. En (a) el padre alto es homozigoto. En (b) el padre alto es heterozigoto. Se puede determinar el genotipo de cada padre alto examinando los descendientes del cruce con una planta enana homozigota recesiva.

dientes serán altos (*Ee*) y la otra mitad enanos (*ee*). Por consiguiente, una proporción 1:1 alto/enano demuestra la naturaleza heterozigota de las plantas altas de genotipo desconocido. El resultado del cruce prueba refuerza las conclusiones de Mendel que separan los factores que controlan los caracteres alto y enano.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo son capaces los genéticos de determinar experimentalmente si un organismo que expresa un carácter dominante es homozigoto o heterozigoto?

3.3 El cruce dihíbrido de Mendel reveló su cuarto postulado: la transmisión independiente

Como ampliación lógica de la realización de cruces monohíbridos, Mendel también diseñó experimentos en donde se examinaban simultáneamente dos caracteres. Tal cruce, que implica dos pares de caracteres alternativos, se denomina **cruce dihíbrido,** o **cruce de dos factores.** Por ejemplo, si plantas de guisante con semillas amarillas, que también son redondas, se cruzan con plantas con semillas verdes, que también son rugosas, aparecerán los resultados presentados en la Figura 3.5. Todos los descendientes F_1 tendrán semillas amarillas y redondas. Por consiguiente, es evidente que amarillo es dominante sobre verde y que redondo es dominante sobre rugoso. En este cruce dihíbrido, si se permite que los individuos de F_1 se autofecunden, aproximadamente 9/16 de las plantas F_2 expresarán amarillo y redondo, 3/16 amarillo y rugoso, 3/16 verde y redondo y 1/16 verde y rugoso[2].

Una variante de este cruce se presenta también en la Figura 3.5. En lugar de cruzar un padre P_1 con los caracteres dominantes (amarillo, redondo) con otro con los caracteres recesivos (verde, rugoso), se cruzan plantas con semillas amarillas y rugosas con plantas con semillas verdes y redondas. A pesar del cambio de los fenotipos de P_1, tanto la F_1 como la F_2 dan lo mismo que antes.

[2] *Nota del traductor:* quienes expresan los caracteres amarillo/verde o liso/rugoso son las semillas, no las plantas, es decir, 9/16 de las semillas F_2 (que se desarrollarán en plantas F_1), expresarán, etc.

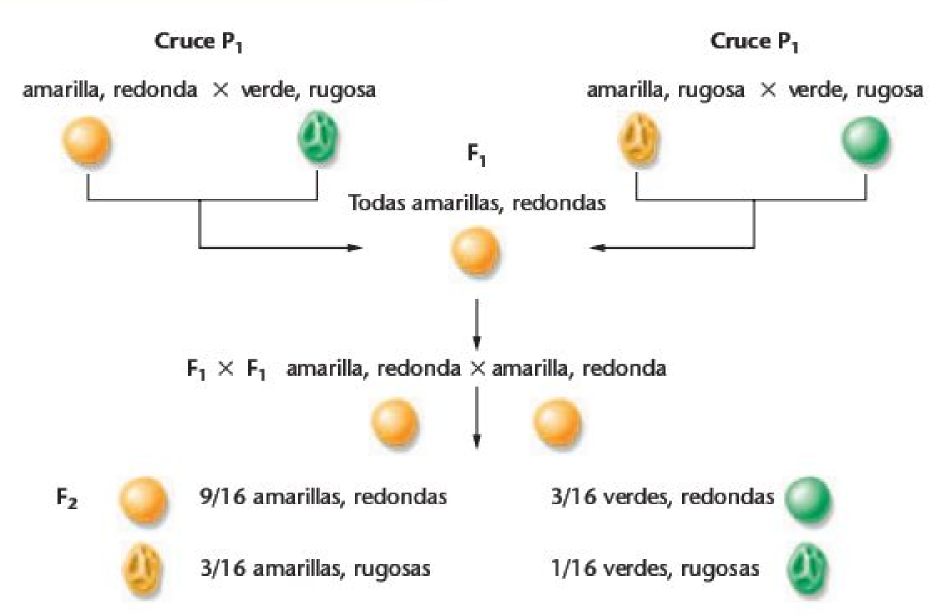


FIGURA 3.5 Resultados en F_1 y en F_2 del cruce dihíbrido mendeliano entre semillas de guisante amarillas, redondas con verdes, rugosas, y entre semillas de guisante amarillas, rugosas con verdes, redondas.

La transmisión independiente

Podemos entender más fácilmente los resultados de un cruce dihíbrido si lo consideramos teóricamente compuesto por dos cruces monohíbridos realizados independientemente. Piense en los dos grupos de caracteres que se heredan independientemente uno del otro; es decir, la probabilidad de que cualquier planta tenga semillas amarillas o verdes no está en absoluto influenciada por la probabilidad de que esta planta tenga semillas redondas o rugosas. Así, debido a que amarillo es dominante sobre verde, todas las plantas F_1 de este primer cruce teórico tendrán semillas amarillas. En el segundo cruce teórico, todas las plantas F_1 tendrán semillas redondas, porque redondo es dominante sobre rugoso. Cuando Mendel examinó las plantas F_1 del cruce dihíbrido, todas eran amarillas y redondas, tal como se preveía.

Los resultados previstos en F_2 del primer cruce son 3/4 amarillas y 1/4 verdes. De manera similar, el segundo cruce produciría 3/4 redondas y 1/4 rugosas. En la Figura 3.5 se muestra que en el cruce dihíbrido, 12/16 de todas las semillas de F_2 son amarillas y 4/16 son verdes, presentando la proporción 3:1 (3/4:1/4). De igual manera, 12/16 de las semillas de la F_2 son redondas y 4/16 rugosas, presentando de nuevo la proporción 3:1(3/4:1/4).

Ya que los dos pares de caracteres alternativos se heredan independientemente, podemos predecir las frecuencias de todos los posibles fenotipos de F_2, aplicando la **ley del producto** de probabilidades: *Cuando se dan simultáneamente dos sucesos independientes, la probabilidad conjunta resultante es igual al producto de las probabilidades de cada uno de ellos*. Por ejemplo, la probabilidad de que una semilla de F_2 sea amarilla *y* redonda es (3/4)(3/4) o (9/16), debido a que las 3/4 partes de todas las semillas de F_2 tienen que ser amarillas y las 3/4 partes de todas las semillas de F_2 tienen que ser redondas.

Se puede calcular de manera similar la probabilidad de los otros tres fenotipos F_2: amarillo (3/4) *y* rugoso (1/4) tienen que estar presentes juntos los 3/16 de las veces; verde (1/4) *y* redondo (3/4) los 3/16 de las veces; y verde (1/4) *y* rugoso (1/4) el 1/16 de las veces. Estos cálculos se presentan en la Figura 3.6. Queda claro el porqué los resultados de F_1 y F_2 son idénticos si los padres del cruce inicial son amarillo y redondo con verde y rugoso, o si son amarillo y rugoso con verde y redondo. En ambos cruces, el genotipo F_1 de todas las plantas es idéntico. Cada una de las plantas es heterozigota para los dos pares de genes. Por ello, la generación F_2 es idéntica en ambos cruces.

De acuerdo con resultados similares en numerosos cruces dihíbridos, Mendel propuso un cuarto principio.

4. TRANSMISIÓN INDEPENDIENTE

En la formación de los gametos, los pares de factores que segregan se transmiten independientemente uno de otro.

Este principio estipula que la segregación de cualquier par de factores se da independientemente de cualquier otro. Recuerde que, como consecuencia de la segregación, cada gameto recibe uno de los miembros de cada par de factores. Para un par dado, cualquier factor que se reciba no influye en el resultado de la segregación de cualquier otro par. Por ello, de acuerdo con el principio de **transmisión independiente**, se formarán todas las posibles combinaciones de gametos en igual frecuencia.

En la Figura 3.7 se muestra la transmisión independiente en la formación de la generación F_2, dispuesta en un tablero de Punnett. Examine la formación de los gametos por las plantas de F_1. La segregación prescribe que cada gameto tiene que recibir un alelo *V* o *v*, y un alelo *R* o *r*. La transmisión independiente estipula que las cuatro combinaciones (*VR*, *Vr*, *vR* y *vr*) se formarán con igual probabilidad.

En las fecundaciones $F_1 \times F_1$, cada zigoto tiene igual probabilidad de recibir una de las cuatro combinaciones de cada padre. Si se produce un gran número de descendientes, el resultado será 9/16 amarillas y redondas, 3/16 amarillas y rugosas, 3/16 verdes y redondas y 1/16 verdes y rugosas, lo que se

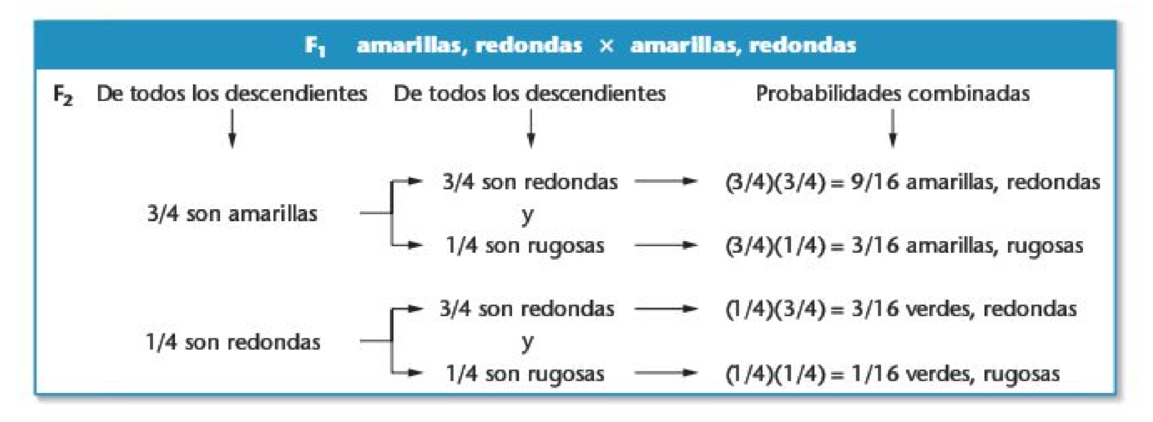


FIGURA 3.6 Cálculo de las probabilidades combinadas de cada fenotipo F_2 para dos caracteres que se heredan independientemente. La probabilidad de que cada planta lleve semillas amarillas o verdes es independiente de la probabilidad de que lleve semillas redondas o rugosas.

Seminario Web 3.2
Transmisión independiente

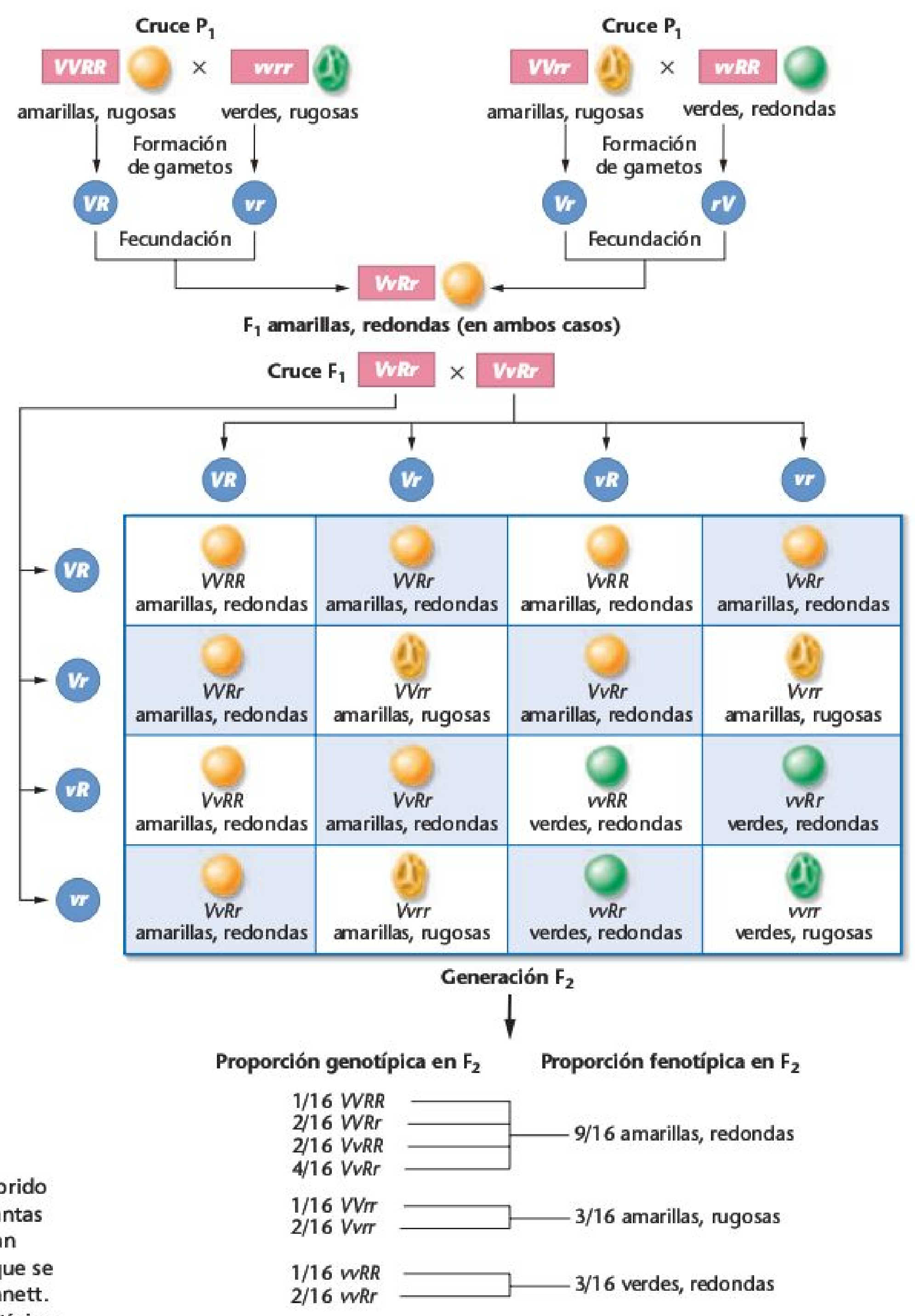


FIGURA 3.7 Análisis del cruce dihíbrido presentado en la Figura 3.5. Las plantas heterozigotas de F_1 se autofecundan para dar lugar a la generación F_2, que se calcula utilizando el tablero de Punnett. Se presentan las proporciones fenotípicas y genotípicas de F_2.

designa como **proporción mendeliana del dihibridismo 9:3:3:1.** Esta es una proporción ideal basada en la probabilidad de las segregaciones implicadas, en la transmisión independiente y en la fecundación al azar. La proporción ideal se obtendrá raramente, debido a desviaciones estrictamente aleatorias, sobre todo si se obtiene un número pequeño de descendientes.

¿Cómo lo sabemos?

¿Qué observaciones experimentales condujeron a Mendel a postular que cada par de factores que segregan se transmite independientemente de otros pares de factores que segregan en la formación de gametos?

El cruce prueba: dos caracteres

También podemos aplicar el cruce prueba a individuos que expresan dos caracteres dominantes, pero de genotipo desconocido. Por ejemplo, la manifestación en F_2 del fenotipo amarillo y redondo descrito más arriba, puede ser consecuencia de los genotipos *VVRR*, *VVRr*, *VvRR* o *VvRr*. Si se cruza una planta desarrollada a partir de una semilla amarilla y redonda de F_2 con una planta verde y rugosa (*vvrr*), homozigota recesiva, el análisis de los descendientes nos indicará correctamente el genotipo de dicha semilla amarilla y redonda. Cada uno de estos genotipos dará lugar a una serie de gametos diferentes que, en un cruce prueba, darán lugar a descendientes de fenotipos distintos. En la Figura 3.8 se presentan tres casos.

Ahora resuelva esto

El Problema 3.9 de la página 68 se refiere a una serie de cruces dihíbridos mendelianos, en donde se deben determinar los genotipos de los padres en cierto número de casos.

Sugerencia: en cada caso, anote todo lo que sepa con certeza. Esto reduce el problema a lo esencial, aclarando lo que necesita determinar. Por ejemplo, la planta amarilla y rugosa del caso (b) debe de ser homozigota para los alelos recesivos rugosos y llevar al menos un alelo dominante para el carácter amarillo. Habiendo establecido esto, sólo se necesita determinar el restante alelo para el color del cotiledón.

3.4 Los cruces trihíbridos demuestran que los principios de Mendel son aplicables a la herencia de caracteres múltiples

Hasta ahora hemos considerado la herencia de dos pares de caracteres alternativos. Mendel demostró que el proceso de segregación y de transmisión independiente se puede aplicar a tres pares de caracteres alternativos mediante lo que se denomina **cruce trihíbrido**, y también **cruce de tres factores**.

Aunque un cruce trihíbrido es algo más complejo que un cruce dihíbrido, se puede calcular fácilmente el resultado si se siguen los principios de la segregación y de la transmisión independientes. Por ejemplo, consideremos el cruce que se muestra en la Figura 3.9, en donde las parejas de genes que representan a los caracteres alternativos teóricos se simbolizan por *A/a*, *B/b* y *C/c*. En el cruce de *AABBCC* × *aabbcc*, todos los individuos de F_1 son heterozigotos para los tres pares de genes. Su genotipo, *AaBbCc*, da lugar a un fenotipo que expresa los caracteres dominantes *A*, *B* y *C*. Cada individuo de F_1 produce 8 tipos diferentes de gametos con igual frecuencia. A partir de aquí podremos construir un tablero de Punnett con 64 cuadros y leer los fenotipos. Debido a que tal método es muy laborioso, en cruces en los que están implicados muchos factores se ha diseñado otro método, el método de la bifurcación en línea, para calcular las proporciones esperadas.

El método de la bifurcación en línea o esquema ramificado

Es mucho más fácil considerar cada par de caracteres alternativos por separado y luego combinar los resultados mediante el

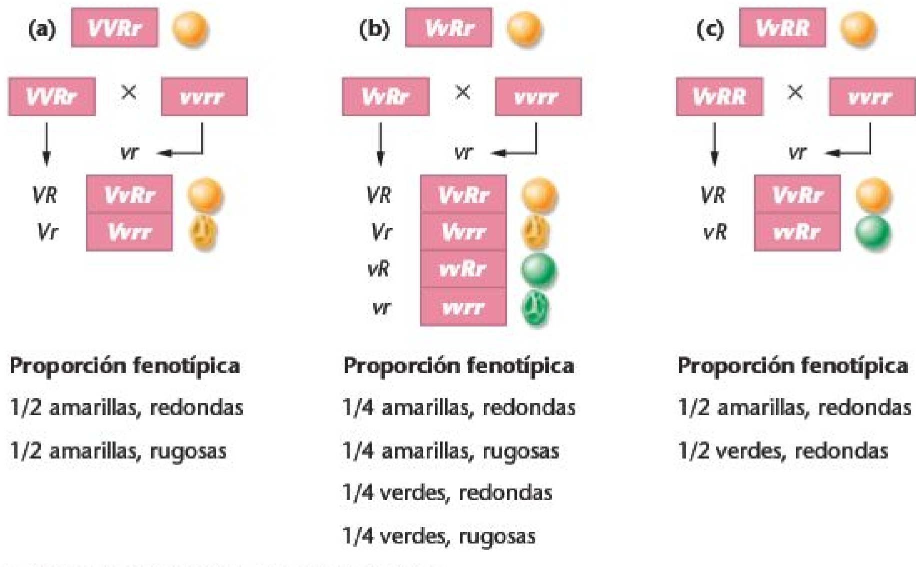


FIGURA 3.8 Cruce prueba para dos caracteres independientes.

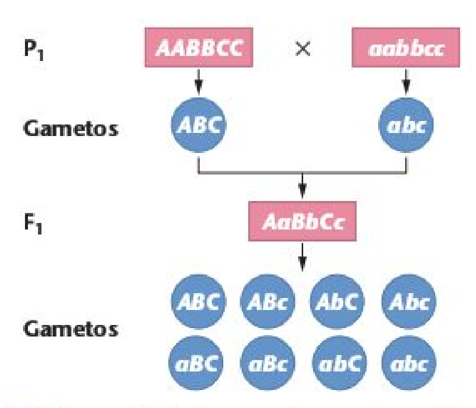


FIGURA 3.9 Formación de los gametos en P_1 y en F_1 en un cruce trihíbrido.

método de la bifurcación en línea, que se presenta en la Figura 3.6. Este método, también llamado un **esquema ramificado**, se basa en la aplicación simple de las leyes de la probabilidad establecidas para los cruces dihíbridos. Se asume que cada par de genes se comporta independientemente en la formación de los gametos.

Cuando se hace el cruce monohíbrido *AA* × *aa*, sabemos que

1. Todos los individuos F_1 tienen el genotipo *Aa* y expresan el fenotipo representado por el alelo *A*, que llamaremos fenotipo *A* a partir de ahora.
2. La F_2 estará formada por individuos de fenotipo *A* o de fenotipo *a* en la proporción 3:1, respectivamente.

La misma generalización se puede aplicar en los cruces *BB* × *bb* y *CC* × *cc*. Así, en F_2, 3/4 de todos los organismos expresarán el fenotipo A, 3/4 el *B* y 3/4 el *C*. De igual manera, 1/4 de todos los organismos expresarán el fenotipo *a*, 1/4 el *b* y 1/4 el *c*. Se puede predecir la proporción de organismos que expresarán cada combinación fenotípica asumiendo que la fecundación, que sigue a la transmisión independiente de estos tres pares de genes en la formación de los gametos, se ha realizado al azar. Simplemente tenemos que aplicar de nuevo la ley del producto de las probabilidades.

En la Figura 3.10 se presentan las proporciones fenotípicas calculadas en F_2 utilizando el método de la bifurcación en línea. Adoptan la proporción trihíbrida 27:9:9:9:3:3:3:1. Se puede aplicar el mismo método para solucionar cruces en los que estén implicados cualquier número de pares de genes, *a condición* de que todos los pares de genes se transmitan independientemente. más tarde veremos que esto no siempre ocurre así. Sin embargo, pareció ser cierto para todos los caracteres de Mendel.

Advierta que en la Figura 3.10 sólo se han obtenido las proporciones fenotípicas de F_2. También es posible generar las proporciones genotípicas. Para hacerlo, consideremos de nuevo a los pares de genes *A/a*, *B/b* y *C/c* separadamente. Por ejemplo, para el par *A/a* el cruce de F_1 es *Aa* × *Aa*. En F_2 se produce una proporción fenotípica de 3/4 *A*:1/4 *a*. Sin embargo, la proporción genotípica en F_2 es diferente; 1/4 *AA*:1/2 *Aa*:1/4 *aa*. Utilizando la Figura 3.10 como modelo, situaremos estas frecuencias genotípicas en el lado izquierdo. Cada una estará conectada con tres líneas a 1/4 *BB*, 1/2 *Bb* y 1/4 *bb* respectivamente. De cada una de las nueve, extenderemos tres líneas más hacia los genotipos 1/4 *CC*, 1/2 *Cc* y 1/4 *cc*. En el lado derecho del esquema completo aparecerán 27 genotipos y sus frecuencias.

Ahora resuelva esto

En el Problema 3.17 de la página 69 se le pide que utilice el método de la bifurcación en línea para determinar el resultado de una serie de cruces trihíbridos.

Sugerencia: al usar el método de la bifurcación en línea, considere cada par de genes independientemente. Por ejemplo, en este problema, se predice primero el resultado en cada cruce para los genes *A/a*, luego para los genes *B/b* y finalmente para los genes *C/c*. Entonces ya estará preparado para obtener el resultado de cada cruce utilizando el método de la bifurcación en línea.

Obtención de los fenotipos trihíbridos en F_2

A o a	*B o b*	*C o c*	Proporción combinada
3/4 *A*	3/4 *B*	3/4 *C*	(3/4)(3/4)(3/4) *ABC* = 27/64 *ABC*
		1/4 *c*	(3/4)(3/4)(1/4) *ABc* = 9/64 *ABc*
	1/4 *b*	3/4 *C*	(3/4)(1/4)(3/4) *AbC* = 9/64 *AbC*
		1/4 *c*	(3/4)(1/4)(1/4) *Abc* = 3/64 *Abc*
1/4 *a*	3/4 *B*	3/4 *C*	(1/4)(3/4)(3/4) *aBC* = 9/64 *aBC*
		1/4 *c*	(1/4)(3/4)(1/4) *aBc* = 3/64 *aBc*
	1/4 *b*	3/4 *C*	(1/4)(1/4)(3/4) *abC* = 3/64 *abC*
		1/4 *c*	(1/4)(1/4)(1/4) *abc* = 1/64 *abc*

FIGURA 3.10 Obtención de las proporciones en F_2 de un trihibridismo, utilizando el método de la bifurcación en línea o esquema ramificado, que se basa en las probabilidades esperadas de cada fenotipo.

En los cruces entre dos o más pares de genes, el cálculo de los gametos y del resultado de los fenotipos y genotipos es bastante complejo. Diversas reglas matemáticas simples le permitirán comprobar la exactitud de los diversos pasos necesarios para resolver problemas de genética. Primero, se tiene que determinar el número de pares de genes en heterozigosis (n) implicado en el cruce. Por ejemplo, si se trata del cruce $AaBb \times AaBb$, $n = 2$; para $AaBbCc \times AaBbCc$, $n = 3$. Para $AaBBCcDd \times AaBBCcDd$, $n = 3$ (debido a que el gen B no está en heterozigosis). Una vez se determine n, 2^n es el número de gametos diferentes que puede formar cada padre; 3^n es el número de genotipos diferentes que se obtienen después de la fecundación; y 2^n es el número de fenotipos diferentes que se obtienen de estos genotipos. En la Tabla 3.1 se resumen estas reglas, que pueden aplicarse a cruces en los que estén implicados cualquier número de genes, *siempre y cuando se transmitan independientemente*.

3.5 El trabajo de Mendel fue redescubierto a principios del siglo XX

El trabajo de Mendel, que se inició en 1856, se presentó en la Sociedad de Historia Natural de Brünn en 1865 y se publicó el año siguiente. Sin embargo, sus descubrimientos no fueron en gran parte conocidos durante unos 35 años. Se han sugerido muchas razones para explicar por qué el significado de esta investigación no fue reconocido inmediatamente.

Primero, el apego de Mendel por el análisis matemático de la probabilidad de los sucesos era un enfoque completamente inusual en ese momento y pudo parecer extraño a sus contemporáneos. Pero más importante fue que las conclusiones deducidas de tal análisis no encajaban bien con las hipótesis existentes sobre el origen de la variación en los organismos. Los estudiosos de la teoría evolutiva, estimulados por las propuestas de Charles Darwin y de Alfred Rusell Wallace, creían en la **variación continua**, según la cual los descendientes eran una mezcla de los fenotipos de los padres. Por el contrario, Mendel emitió la hipótesis de que la herencia se debía a unidades discretas o particuladas, dando lugar, por consiguiente, a **variación discontinua**. Por ejemplo, Mendel propuso que los descendientes F_2 de un cruce dihíbrido expresaban simplemente los caracteres producidos por combinaciones nuevas de factores previamente existentes. Por ello, las hipótesis de Mendel no encajaban bien con las preconcepciones de los evolucionistas acerca de las causas de la variación.

Además, es también probable que los contemporáneos de Mendel no captaran el significado de sus postulados, que explican *cómo* se transmite la variación a los descendientes. En su lugar, quizás intentaron interpretar su trabajo de una forma que planteaba la idea de *por qué* ciertos fenotipos sobreviven preferencialemente. Fue esta última pregunta la que se había planteado en la teoría de la selección natural, pero que no fue planteada por Mendel. Muy bien pudo ser que la visión colectiva de los colegas científicos de Mendel estaba oscurecida por el impacto de la extraordinaria teoría de la evolución orgánica.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué descubrimiento confirmó que los factores de Mendel a pares eran realmente parejas de cromosomas homólogos?

3.6 La correlación de los postulados de Mendel con el comportamiento de los cromosomas constituyó el fundamento de la genética de la transmisión moderna

Cerca de finales del siglo XIX, una observación notable preparó el escenario para el renacimiento del trabajo de Mendel: el descubrimiento en 1879 por Walter Flemming de los cro-

TABLA 3.1 REGLAS MATEMÁTICAS SIMPLES, ÚTILES PARA RESOLVER PROBLEMAS GENÉTICOS

Cruces entre organismos heterozigotos para genes que se transmiten independientemente

Número de pares de genes heterozigotos	Número de los diferentes tipos de gametos formados	Número de los diferentes genotipos producidos	Número de los diferentes fenotipos producidos*
n	2^n	3^n	2^n
1	2	3	2
2	4	9	4
3	8	27	8
4	16	81	16

* En la cuarta columna se supone que la dominancia y recesividad actúan en todos los pares de genes.

mosomas. Flemming describió el comportamiento de estas estructuras filamentosas en los núcleos de células de salamandra en división. Como consecuencia del descubrimiento de Flemming y de muchos otros citólogos, la presencia de un componente nuclear entró a formar parte integral de las ideas alrededor de la herencia. Fue en este contexto en el que los científicos pudieron reexaminar los descubrimientos de Mendel.

En los comienzos del siglo XX, la investigación dirigió un mayor interés en los trabajos de Mendel. Tres botánicos, Hugo DeVries, Karl Correns y Erich von Tschermak, realizaron independientemente experimentos de hibridación similares a los de Mendel. Por ejemplo, el trabajo de DeVries se había centrado en caracteres unidad y en sus experimentos con varias especies vegetales demostró el principio de la segregación. Buscó en la literatura científica disponible y encontró que el trabajo de Mendel se había anticipado a sus propias conclusiones. Correns y Tschermak también habían alcanzado conclusiones similares a las de Mendel.

En 1902, los citólogos Walter Sutton y Theodor Boveri, independientemente, publicaron trabajos relacionando sus descubrimientos sobre el comportamiento de los cromosomas en la meiosis con los principios mendelianos de la segregación y de la transmisión independiente. Señalaron que la separación de los cromosomas en la meiosis podría ser la base citológica de estos dos principios. Aunque creían que los factores de Mendel eran probablemente cromosomas, en lugar de genes en cromosomas, sus hallazgos reestablecieron la importancia del trabajo de Mendel, lo que sirvió de fundamento para las posteriores investigaciones en genética.

Basándonos en sus estudios, a Sutton y Boveri se les reconoce como iniciadores de la **teoría cromosómica de la herencia**. Como veremos en los capítulos siguientes, los trabajos de Thomas H. Morgan, Alfred H. Sturtevant, Calvin Bridges y otros establecieron más allá de toda duda razonable que la hipótesis de Sutton y Boveri era correcta.

Factores, genes y cromosomas homólogos

Debido a que la correlación entre las observaciones de Sutton y Boveri y los principios mendelianos es el fundamento de la interpretación moderna de la genética de la transmisión, examinaremos esta correlación con cierto detalle.

Como se indicaba en el Capítulo 2, cada especie posee un número específico de cromosomas en cada núcleo de las células somáticas, característico de dicha especie. En organismos diploides, en la formación de los gametos, este número se reduce exactamente a la mitad (n), y cuando dos gametos se unen en la fecundación, se restablece el número diploide. Sin embargo, en la meiosis el número de cromosomas no se reduce de una manera aleatoria. Para los primeros citólogos era claro que el número diploide de cromosomas está compuesto de pares homólogos identificables por su apariencia morfológica y comportamiento. Los gametos tienen un miembro de cada par. La dotación cromosómica de un gameto es así totalmente específica, y el número de cromosomas de cada gameto es igual al número haploide.

Con esta información básica podemos ver la correlación entre el comportamiento de los factores, los cromosomas y los genes. En la Figura 3.11 se presentan los tres principios de Mendel y la explicación cromosómica para cada uno de ellos. Los factores son realmente genes localizados en parejas de cromosomas homólogos [Figura 3.11(a)]. Los miembros de cada pareja de homólogos se separan, o se segregan, en la formación de los gametos [Figura 3.11(b)]. Se representan las dos posibles distribuciones diferentes.

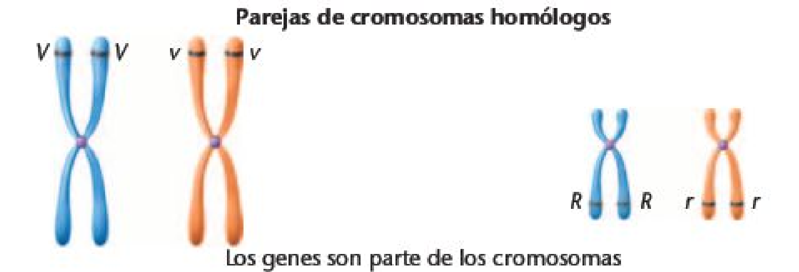
Para ilustrar el principio de la transmisión independiente, es importante distinguir los miembros de cualquier par de cromosomas homólogos. Uno de los miembros de cada par viene del **padre**, mientras que el otro viene de la **madre**. Representamos los diferentes orígenes paternos por colores distintos. Como se muestra en la Figura 3.11(c), los dos pares de homólogos segregan independientemente cuando se forman los gametos. Cada gameto recibe un miembro de cada par. Se forman todas las combinaciones posibles. Si añadimos al esquema los símbolos utilizados en el cruce dihíbrido de Mendel (V, v y R, r), vemos por qué se forma igual número de los cuatro tipos de gametos. El comportamiento independiente de los pares de factores mendelianos (V y R en este ejemplo) se debe al hecho de que se encuentran en parejas distintas de cromosomas homólogos.

Al observar la diversidad fenotípica de los seres vivos vemos que es lógico suponer que hay muchos más genes que cromosomas. De hecho, cada cromosoma está compuesto de un gran número de genes dispuestos linealmente. Los factores de Mendel (que determinan tallo alto o enano, por ejemplo) constituyen realmente un par de genes localizados en un par de cromosomas homólogos. El lugar del cromosoma en donde se sitúa un gen dado se denomina **locus** (pl. **loci**). Las formas diferentes que toma un gen dado, los alelos (V o v), presentan ligeras diferencias en la información genética (amarillo o verde) que determinan el mismo carácter (color de la semilla). Por consiguiente, los alelos son formas alternativas del mismo gen. Aunque hemos estudiado sólo genes con dos alelos, la mayoría de los genes tienen más de dos formas alélicas alternativas. Discutiremos el concepto de alelos múltiples en el Capítulo 4.

Terminamos esta sección revisando los criterios necesarios para clasificar dos cromosomas como parejas homólogas:

1. En la mitosis y en la meiosis, cuando los cromosomas son estructuras visibles, ambos miembros de una pareja homóloga tienen el mismo tamaño y presentan idéntica localización del centrómero.
2. Al principio de la meiosis, los cromosomas homólogos se emparejan, o establecen sinapsis.
3. Los homólogos tienen la misma ordenación lineal de loci génicos.

(a) Factores en parejas (primera profase meiótica)



(b) Segregación de los factores en la formación de los gametos (primera anafase meiótica)

Los homólogos segregan en la meiosis

V V v v V V v v

o

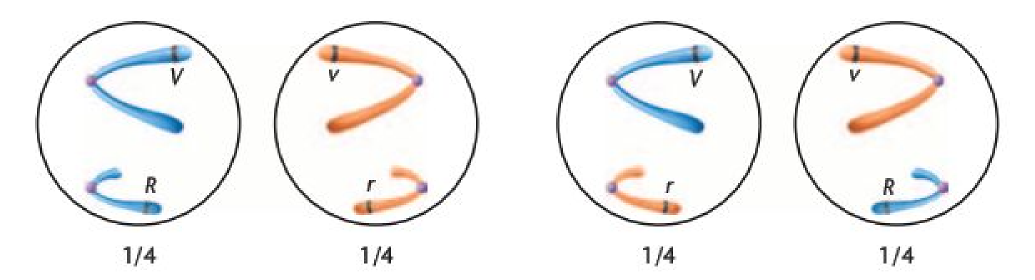
R R r r r r R R

Cada par se separa

Cada par se separa

(c) Transmisión independiente de factores que segregan (después de muchas meiosis)

Los cromosomas no homólogos se transmiten independientemente



Todas las posibles combinaciones gaméticas se forman con igual probabilidad

FIGURA 3.11 Correlación entre los postulados mendelianos de (a) parejas de factores, (b) segregación y (c) transmisión independiente con la presencia de genes localizados en cromosomas homólogos y su comportamiento en la meiosis.

3.7 La transmisión independiente da lugar a una gran variación genética

Una de las consecuencias más importantes de la transmisión independiente es la producción por un individuo de gametos genéticamente diferentes. Debido a que los dos miembros de cualquier pareja de cromosomas homólogos raramente son idénticos genéticamente, si es que lo son alguna vez, se produce variación genética. Por consiguiente, debido a que la transmisión independiente da lugar a todas las combinaciones cromosómicas posibles, se produce una gran diversidad genética.

Hemos visto que para cualquier individuo, el número de gametos posibles con una composición cromosómica distinta es 2^n, en donde n es igual al número haploide. Así, si una especie

tiene un número haploide igual a 4, entonces se podrán formar 2^4 ó 16 combinaciones distintas de gametos como consecuencia de la transmisión independiente. Aunque este número no es muy grande, consideremos a la especie humana, en donde $n = 23$. Si calculamos 2^{23}, encontramos que son posibles algo más de 8 millones de gametos distintos. Como en la fecundación se implica sólo uno de los aproximadamente 8 millones de gametos posibles de cada uno de los dos padres, cada descendiente representa sólo una de las $(2^{23})^3$ combinaciones genéticas posibles. Este número de combinaciones cromosómicas es mucho mayor que el de individuos de la especie humana que viven y han vivido en nuestro planeta! No hay que extrañarse de que, excepto para gemelos idénticos, cada individuo de la especie humana presente una individualidad y una apariencia diferente. La variación genética que aparece por transmisión independiente ha sido muy importante en el proceso de la evolución de todos los seres vivos.

3.8 Las leyes de probabilidad nos ayudan a explicar los fenómenos genéticos

Como se mencionó anteriormente, las proporciones genéticas se expresan más adecuadamente como probabilidades —por ejemplo, 3/4 alto:1/4 enano. Estos valores predicen el resultado de cada fecundación, de tal manera que la probabilidad de que cada zigoto tenga el potencial genético de ser alto es 3/4, mientras que el potencial de ser enano es 1/4. El rango de probabilidad va de 0, cuando un suceso *es seguro que no va a ocurrir*, hasta 1, cuando *es seguro que va a ocurrir*. En esta sección consideraremos la relación de la probabilidad con la genética.

Las leyes del producto y de la suma

Cuando dos o más sucesos ocurren independientemente uno del otro, pero al mismo tiempo, podemos calcular la probabilidad del resultado posible cuando ambos sucesos ocurran juntos. Esto se consigue aplicando la **ley del producto**. Como se mencionó en la discusión anterior de la transmisión independiente (véase la página 44), se dice que la probabilidad de que dos o más resultados ocurran simultáneamente es igual al *producto* de sus probabilidades individuales. Dos o más sucesos son independientes si el resultado de cada uno no afecta al resultado de cualquiera de los otros que se estén considerando.

Para ilustrar el uso de la ley del producto, consideremos los resultados posibles de un suceso al lanzar un penique (P) y un níquel[1] (N) al mismo tiempo y examinemos todas las combinaciones posibles de caras (CA) y cruces (CR) que puedan salir. Hay cuatro posibles resultados:

$$(P_{CA}:N_{CA}) = (1/2)(1/2) = 1/4$$
$$(P_{CR}:N_{CA}) = (1/2)(1/2) = 1/4$$
$$(P_{CA}:N_{CR}) = (1/2)(1/2) = 1/4$$
$$(P_{CR}:N_{CR}) = (1/2)(1/2) = 1/4$$

La probabilidad de obtener una cara o una cruz con cualquier moneda es 1/2, independientemente del resultado con la otra moneda. La predicción es que las cuatro posibles combinaciones ocurren con igual probabilidad.

Si estuviéramos interesados en calcular la probabilidad de cualquier resultado que pueda producirse en más de una manera, aplicaríamos la **ley de la suma** para cada uno de los resultados mutuamente excluyentes, como se indicó más arriba. Por ejemplo, ¿cuál es la probabilidad de que al lanzar el penique y el níquel obtengamos una cara y una cruz? En tal caso, no nos preocuparemos de si es el penique o el níquel el que sale cara, dado que la otra moneda tiene el resultado alternativo. Hay dos maneras de que se cumpla el resultado esperado [$(P_{CA}:N_{CR})$ y $(P_{CR}:N_{CA})$], cada una de ellas con 1/4 de probabilidad. La ley de la suma afirma que la probabilidad de obtener un resultado, cuando dicho resultado se puede obtener en dos o más sucesos, es igual a la suma de las probabilidades de cada uno de tales sucesos. Por ello, de acuerdo con la ley de la suma, la probabilidad global en nuestro caso es igual a

$$(1/4) + (1/4) = (1/2)$$

Se predice que la mitad de todas las tiradas darán lugar al resultado esperado.

Estas simples leyes de probabilidad serán útiles en nuestro estudio de la genética de la transmisión y cuando resolvamos problemas de genética. De hecho, ya hemos aplicado la ley del producto cuando utilizamos el método de la bifurcación en línea para calcular los resultados fenotípicos de los cruces mendelianos dihíbridos y trihíbridos. Cuando deseemos saber el resultado de un cruce, solo necesitamos calcular la probabilidad de cada resultado posible. Los resultados de este cálculo nos permitirán predecir la proporción de descendientes que tendrá cada fenotipo o cada genotipo.

Hay que recordar un punto muy importante cuando tratemos con la probabilidad. Las predicciones de resultados posibles normalmente se cumple solo con tamaños muestrales grandes. Si predecimos que los 9/16 de los descendientes de un cruce dihíbrido presentarán los dos caracteres dominantes, es improbable que, en una muestra pequeña, exactamente 9 de cada 16 los presenten. más bien, nuestra predicción es que, en un gran número de descendientes, aproximadamente 9/16 expresarán este fenotipo. Las desviaciones respecto de las proporciones esperadas en muestras de tamaño pequeño se atribuyen a desviaciones debidas al azar, tema que trataremos cuando estudiemos estadística en la sección siguiente. Como veremos, el impacto de las desviaciones debidas estrictamente al azar disminuye a medida que el tamaño muestral aumenta.

[1] *Nota del traductor:* penique y níquel son dos monedas de los EE.UU., con valores faciales de 1 y 5 centavos, de cobre y níquel respectivamente.

Probabilidad condicional

A veces desearíamos calcular la probabilidad de un resultado que depende de una condición concreta relacionada con dicho resultado. Por ejemplo, en la F_2 de un cruce monohíbrido mendeliano entre plantas altas y enanas ¿cuál es la probabilidad de que una planta alta sea heterozigota (en lugar de homozigota)? La condición que hemos impuesto es considerar sólo los descendientes altos de F_2, ya que sabemos que todas las plantas enanas son homozigotas.

Debido a que el resultado y la condición concreta no son independientes, no podemos aplicar la ley del producto de la probabilidad. La probabilidad de tal resultado se denomina **probabilidad condicional.** En su expresión más sencilla, nos preguntamos cual es la probabilidad de que se dé un resultado, dada la condición específica de la que este resultado depende. Llamemos a esta probabilidad p_c.

Para resolver p_c, debemos considerar la probabilidad tanto del resultado que nos interesa como del de la condición específica que incluye al resultado. Estas son (a) la probabilidad de que una planta de F_2 sea heterozigota como consecuencia de haber recibido tanto el alelo dominante como el recesivo (p_a) y (b) la probabilidad de la condición bajo la cual los sucesos están siendo estimados, es decir, ser alta (p_b):

p_a = probabilidad de que cualquier planta de F_2 herede un alelo dominante y un alelo recesivo (es decir, que sea heterozigota)

= 1/2

p_b = Probabilidad de que una planta de F_2 de un cruce monohíbrido sea alta

= 3/4

Para calcular la probabilidad condicional (p_c), dividiremos p_a por p_b:

$$
\begin{aligned}
p_c &= p_a/p_b \\
&= (1/2)/(3/4) \\
&= (1/2)(4/3) \\
&= 4/6 \\
p_c &= 2/3
\end{aligned}
$$

La probabilidad condicional de que cualquier planta alta sea heterozigota es dos tercios (2/3). Como promedio, dos tercios de las plantas altas de F_2 serán heterozigotas. Podemos confirmar este cálculo reexaminando la Figura 3.3.

La probabilidad condicional tiene muchas aplicaciones en genética. En el consejo genético, por ejemplo, puede calcularse la probabilidad (p_c) de que una persona no afectada, hermano o hermana de un individuo que expresa un trastorno recesivo, sea portador del alelo que causa la enfermedad (es decir, sea heterozigoto). Suponiendo que ambos padres no están afectados (y que por consiguiente son portadores), el cálculo de p_c es idéntico al del ejemplo anterior. El valor de $p_c = 2/3$.

El teorema binomial

Finalmente, la probabilidad se puede utilizar en casos en donde es posible uno de los dos resultados alternativos en cada uno de una serie de ensayos. Aplicando el **teorema del binomio,** podemos calcular con bastante rapidez la probabilidad de cualquier serie concreta de resultados entre un gran número de sucesos potenciales. Por ejemplo, en familias de cualquier tamaño podemos calcular la probabilidad de cualquier combinación de hijos e hijas. Por ejemplo, en una familia con cuatro hijos, podemos calcular la probabilidad de que dos hijos sean de un sexo y los otros dos del otro.

La expresión del teorema del binomio es:

$$(a + b)^n = 1$$

n	Binomio	Binomio expandido
1	$(a + b)^1$	$a + b$
2	$(a + b)^2$	$a^2 + 2ab + b^2$
3	$(a + b)^3$	$a^3 + 3a^2b + 3ab^2 + b^3$
4	$(a + b)^4$	$a^4 + 4a^3b + 6a^2b^2 + 4ab^3 + b^4$
5	$(a + b)^5$	$a^5 + 5a^4b + 10a^3b^2 + 10a^2b^3 + 5ab^4 + b^5$
	etc.	etc.

en donde *a* y *b* son las probabilidades respectivas de los dos resultados alternativos y *n* es igual al número de ensayos.

A medida que se expande el binomio para cada valor de *n*, el triángulo de Pascal, que se muestra en la Tabla 3.2, es útil para determinar los coeficientes de cada término de la ecuación binomial. En dicho triángulo, cada número es la suma de los dos números que están inmediatamente encima de él.

Para expandir cualquier binomio, se determinan los distintos exponentes (p.e. a^3b^2) utilizando el patrón

$$(a + b)^n = a^n, a^{n-1}b, a^{n-2}b^2, a^{n-3}b^3, \ldots, b^n$$

Los coeficientes que preceden a cada expresión se pueden calcular más fácilmente utilizando el triángulo de Pascal. Adviértase que todos los valores distintos de 1 se obtienen sumando los dos números que se encuentran directamente encima de ellos.

TABLA 3.2 **TRIÁNGULO DE PASCAL**

n	Coeficientes numéricos
n	1
1	1 1
2	1 2 1
3	1 3 3 1
4	1 4 6 4 1
5	1 5 10 10 5 1
6	1 6 15 20 15 6 1
7	1 7 21 35 35 21 7 1
etc.	etc.

* Advierta que todos los números distintos de 1 se obtienen sumando los dos números que están inmediatamente por encima.

Utilizando el método anterior, la expansión inicial de $(a + b)^7$ es

$$a^7 + 7a^6b + 21a^5b^2 + 35a^4b^3 + \ldots + b^7$$

Si aplicamos el teorema del binomio, podemos volver a nuestra primera pregunta: *¿Cuál es la probabilidad de que en una familia de cuatro hijos, dos sean varones y dos mujeres?*

En primer lugar, asignaremos las probabilidades iniciales a cada resultado:

$$a = \text{varón} = 1/2$$
$$b = \text{mujer} = 1/2$$

Luego localizaremos el término adecuado en la expansión del binomio, en donde $n = 4$:

$$(a + b)^4 = a^4 + 4a^3b + 6a^2b^2 + 4ab^3 + b^4$$

En cada término, el exponente de a representa el número de varones y el exponente de b el número de mujeres. Por consiguiente, la expresión correcta de p es

$$\begin{aligned} p &= 6a^2b^2 \\ &= 6(1/2)^2(1/2)^2 \\ &= 6(1/2)^4 \\ &= 6(1/16) \\ &= 6/16 \\ p &= 3/8 \end{aligned}$$

Así, la probabilidad de que familias de cuatro hijos tengan dos varones y dos mujeres es 3/8. De todas las familias con cuatro hijos, se predice que 3 de cada 8 tendrán dos varones y dos mujeres.

Antes de examinar otro ejemplo, advertiremos que se puede aplicar una fórmula para determinar el coeficiente de cualquier serie de exponentes:

$$n!/(s!t!)$$

en donde

n = número total de sucesos

s = número de veces que se da el resultado a

t = número de veces que se da el resultado b

Por consiguiente, $n = s + t$.

El símbolo ! significa **factorial**, que es el producto de todos los números positivos de 1 hasta algún número positivo. Por ejemplo,

$$5! = (5)(4)(3)(2)(1) = 120.$$

Advierta que utilizando factoriales, $0! = 1$.

Utilizando la fórmula, determinemos la probabilidad en una familia de siete de que haya cinco varones y dos mujeres. Así pues, $n = 7$, $s = 5$ y $t = 2$ y. Primero ampliaremos nuestra ecuación para incluir 5 sucesos de resultado a y cinco de resultado b. El término apropiado es:

$$\begin{aligned} p &= \frac{n!}{s!t!}a^sb^t \\ &= \frac{7!}{5!2!}(1/2)^5(1/2)^2 \\ &= \frac{(7)\cdot(6)\cdot(5)\cdot(4)\cdot(3)\cdot(2)\cdot(1)}{(5)\cdot(4)\cdot(3)\cdot(2)\cdot(1)\cdot(2)\cdot(1)}(1/2)^7 \\ &= \frac{(7)\cdot(6)}{(2)\cdot(1)}(1/2)^7 \\ &= \frac{42}{2}(1/2)^7 \\ &= 21(1/2)^7 \\ &= 21(1/128) \\ p &= 21/128 \end{aligned}$$

En familias con siete hijos, la predicción es que, como promedio, 21/128 tendrán cinco varones y dos mujeres.

Los cálculos utilizando el teorema del binomio tienen varias aplicaciones en genética, incluyendo el análisis de los caracteres poligénicos (Capítulo 24) y el estudio del equilibrio en poblaciones (Capítulo 25).

3.9 El análisis de ji-cuadrado evalúa la influencia del azar en los datos genéticos

Las proporciones mendelianas monohíbridas 3:1 y dihíbridas 9:3:3:1 son predicciones teóricas basadas en los siguientes supuestos: (1) cada alelo es o dominante o recesivo, (2) normalmente se produce la segregación, (3) se produce la transmisión independiente y (4) la fecundación es al azar. Los tres últimos supuestos están influenciados por el azar y por consiguiente están sujetos a fluctuaciones aleatorias. Este concepto, el de **desviación al azar**, se comprende más fácilmente lanzando una moneda al aire varias veces y contabilizando el número de caras y de cruces que salgan. En cada tirada hay una probabilidad de 1/2 de que salga cara y una probabilidad de 1/2 de que salga cruz. Por consiguiente, las proporciones esperadas después de muchas tiradas es 1:1. Si una moneda se lanza 1.000 veces, normalmente se observarán *alrededor* de 500 caras y 500 cruces. Cualquier fluctuación razonable de esta proporción hipotética (p.e., 486 caras y 514 cruces) se atribuirá al azar.

Cuando se reduce el número total de tiradas, el impacto de la desviación por azar aumenta. Por ejemplo, si una moneda se lanzara sólo 4 veces, no sería demasiado sorprendente si en las cuatro tiradas salieran sólo caras o sólo cruces. Pero para 1.000 tiradas, el que salieran 1.000 caras o 1.000 cruces sería totalmente inesperado. De hecho, podría pensarse que tal resultado es imposible. Realmente, la predicción de que salieran todo caras o todo cruces en las 1.000 tiradas tiene una probabilidad de sólo $(1/2)^{1.000}$. Ya que $(1/2)^{20}$ representa una probabilidad de menos de 1 en un millón de veces, un suceso que ocurriera con

una probabilidad tan baja como de $(1/2)^{1.000}$ sería prácticamente imposible que se diera.

En todo esto hay dos puntos importantes:

1. El resultado de la segregación, de la transmisión independiente y de la fecundación, como lanzar una moneda al aire, está sujeto a fluctuaciones al azar respecto de los acontecimientos previstos como consecuencia de las desviaciones al azar.
2. A medida que el tamaño muestral aumenta, la desviación promedio respecto del resultado esperado disminuye. Por consiguiente una muestra más grande disminuye el impacto de las desviaciones al azar sobre el resultado final.

Una importante metodología en genética es poder evaluar la desviación observada. Cuando asumimos que los datos se adecuarán a una proporción dada, como 1:1, 3:1 ó 9:3:3:1, establecemos lo que se llama la **hipótesis nula (H_0)**. Se llama así debido a que la hipótesis asume que no hay *diferencia real* entre los **valores observados** (o proporción) y los **valores esperados** (o proporción). La diferencia *aparente* se puede atribuir únicamente al azar. La valoración de la hipótesis nula se realiza mediante análisis estadístico. Sobre esta base, la hipótesis nula puede bien (1) rechazarse, o (2) no rechazarse. Si se rechaza, la desviación observada respecto de la esperada *no* es atribuible sólo al azar; se tienen que reexaminar la hipótesis nula y las suposiciones que la sostienen. Si la hipótesis nula no se rechaza, cualquier desviación observada *es* atribuible al azar.

Una de las pruebas estadísticas más sencillas para comprobar la bondad del ajuste de la hipótesis nula es el **análisis de ji-cuadrado (χ^2)**. Esta prueba tiene en cuenta las desviaciones observadas de cada componente respecto de una proporción esperada, así como el tamaño de la muestra, y las reduce a un único valor numérico. El valor de χ^2 se utiliza luego para estimar cuán frecuentemente la desviación observada, o incluso una desviación mayor de la observada, se puede esperar que se dé estrictamente como consecuencia del azar. La fórmula utilizada en el análisis de ji-cuadrado es:

$$\chi^2 = \Sigma \frac{(o - e)^2}{e}$$

En esta ecuación,

o = valor observado de una clase dada
e = valor esperado de dicha clase

y

Σ = suma de los valores calculados para cada clase

Debido a que $(o - e)$ es la desviación (d) en cada caso, la ecuación se puede simplificar a

$$\chi^2 = \frac{d^2}{e}$$

En la Tabla 3.3(a) se presenta, paso a paso, el procedimiento para calcular el χ^2 para los resultados de F_2 de un hipotético cruce monohíbrido. Si tuviera que analizar estos datos, se tendría que resolver de izquierda a derecha, calculando y poniendo los números apropiados en cada columna. Independientemente de si la desviación $(o - e)$ es positiva o negativa inicialmente, se convierte en positiva después de elevar al cuadrado. En la Tabla 3.3(b) se ilustra el análisis de los resultados de F_2 de un hipotético cruce dihíbrido. Basándose en el estudio de los cálculos realizados en el cruce monohíbrido, compruebe que entiende cómo se calculó cada valor en el ejemplo del dihíbrido

El paso final en el análisis de ji-cuadrado es interpretar el valor de χ^2. Para hacerlo, antes debemos determinar el valor de los **grados de libertad (gl)**, que en este análisis es igual a $n - 1$, en donde n es el número de clases diferentes en las que cada dato puntual puede clasificarse. Para la proporción 3:1, $n = 2$, por lo que gl = 1. Para la proporción 9:3:3:1, gl = 3. Se tienen que tener en cuenta los grados de libertad debido a que, a mayor número de clases, se esperará que haya una mayor desviación como resultado del azar.

Una vez se ha determinado el número de grados de libertad, podemos interpretar el valor de χ^2 en términos de un **valor de probabilidad (p)** correspondiente. Debido a que este cálculo es complejo, el valor de p normalmente se busca en una tabla o gráfica. En la Figura 3.12 se presenta un amplio rango de valores de χ^2 y de p para diversos grados de libertad tanto en el gráfico como en la tabla. Utilizaremos el gráfico para explicar como se determina el valor de p. El pie de la Figura 3.12(b) explica como utilizar la tabla.

Para determinar p se deben seguir los siguientes pasos.

1. Localizar el valor χ^2 en el eje X u horizontal.
2. Dibujar una línea vertical desde dicho punto hasta la línea de la gráfica que representa los *gl* apropiados.
3. Extender una línea horizontal desde ese punto hacia la izquierda, hasta que corte al eje Y o vertical.
4. Estimar, por interpolación, el valor correspondiente de p.

Para nuestro primer ejemplo de la Tabla 3.3 (el cruce monohíbrido), el valor p de 0,48 se puede estimar de este modo [Figura 3.12(a)]. Para el cruce dihíbrido, utilice este método para ver si puede determinar el valor de p. El χ^2 es 4,16 y los *gl* son 3. El valor aproximado de p es 0,26. Utilizando la tabla, en lugar del gráfico, confirme que ambos valores de p se encuentran entre 0,20 y 0,50. Examine la Tabla de la Figura 3.12(b) para confirmarlo.

Interpretación de los cálculos de χ^2

Hasta el momento nos hemos referido sólo a la determinación de p. El aspecto más importante del análisis de χ^2 es comprender lo que significa realmente el valor de p. Utilizaremos el ejemplo del cruce dihíbrido $p = 0,26$ para ilustrarlo. En este planteamiento es más fácil pensar en el valor de p como en el de un porcentaje (p.e. 0,26 = 26 por ciento). En nuestro caso,

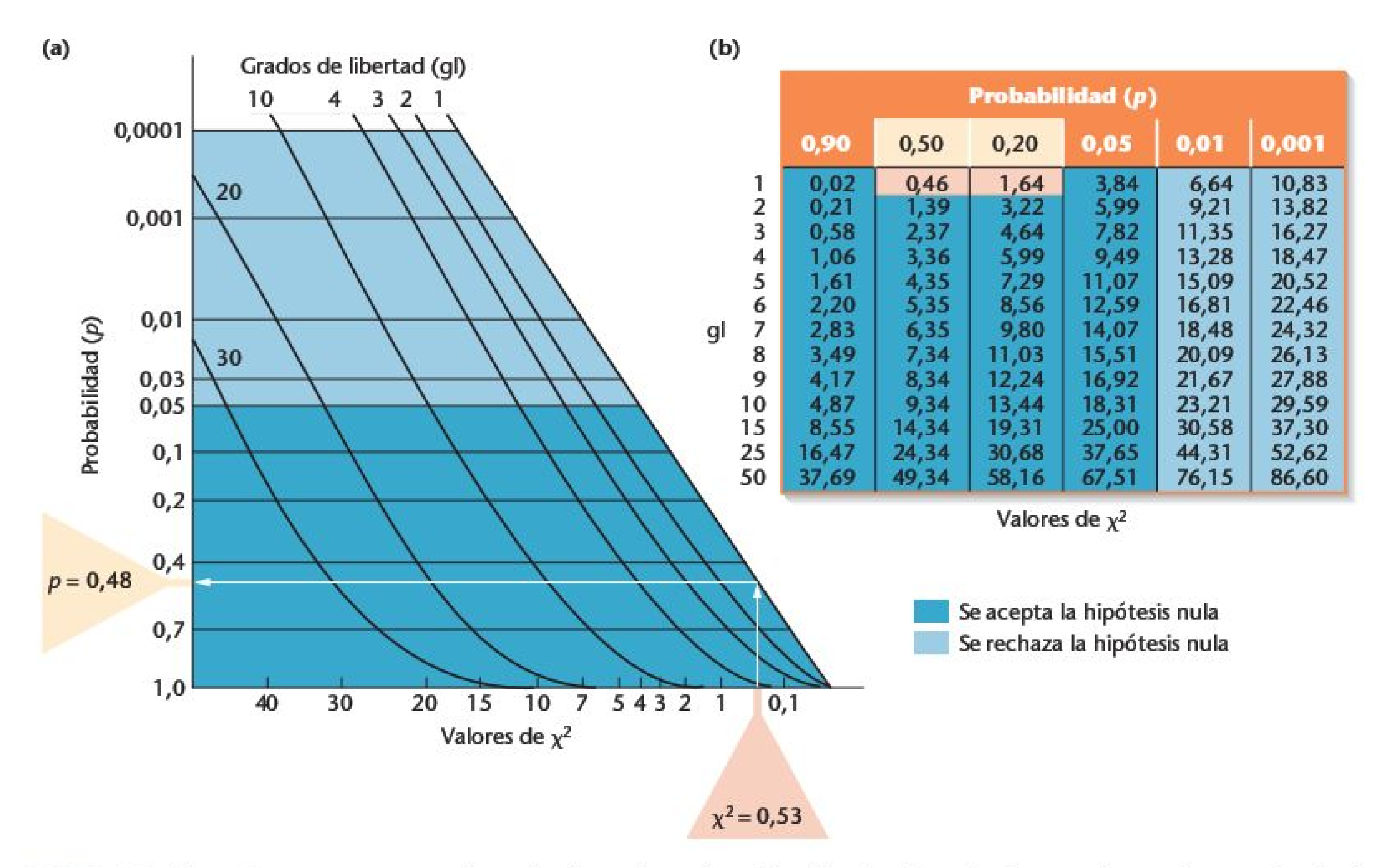
TABLA 3.3 ANÁLISIS DE CHI-CUADRADO

(a) Cruce monohíbrido

Proporción esperada	Observado (*o*)	Experado (*e*)	Desviación (*o* − *e*)	Desviación²	d^2/e
3/4	740	3/4(1.000) = 750	740 − 750 = −10	$(-10)^2 = 100$	100/750 = 0,13
1/4	260	1/4(1.000) = 250	260 − 250 = +10	$(+10)^2 = 100$	100/250 = 0,40
	Total = 1.000				$\chi^2 = 0{,}53$
					$p = 0{,}48$

(b) Cruce dihíbrido

Proporción esperada	*o*	*e*	*o* − *e*	d^2	d^2/e
9/16	587	567	+20	400	0,71
3/16	197	189	+8	64	0,34
3/16	168	189	−21	441	2,33
1/16	56	63	−7	49	0,78
	Total = 1.008				$\chi^2 = 4{,}16$
					$p = 0{,}26$



gl	0,90	0,50	0,20	0,05	0,01	0,001
	Probabilidad (*p*)					
1	0,02	0,46	1,64	3,84	6,64	10,83
2	0,21	1,39	3,22	5,99	9,21	13,82
3	0,58	2,37	4,64	7,82	11,35	16,27
4	1,06	3,36	5,99	9,49	13,28	18,47
5	1,61	4,35	7,29	11,07	15,09	20,52
6	2,20	5,35	8,56	12,59	16,81	22,46
7	2,83	6,35	9,80	14,07	18,48	24,32
8	3,49	7,34	11,03	15,51	20,09	26,13
9	4,17	8,34	12,24	16,92	21,67	27,88
10	4,87	9,34	13,44	18,31	23,21	29,59
15	8,55	14,34	19,31	25,00	30,58	37,30
25	16,47	24,34	30,68	37,65	44,31	52,62
50	37,69	49,34	58,16	67,51	76,15	86,60

FIGURA 3.12 (a) Gráfico para convertir valores de χ^2 en valores de *p*. (b) Tabla de valores de χ^2 para valores seleccionados de gl y *p*. Los valores de χ^2 mayores que los que se muestran para $p = 0{,}05$ justifican el rechazo de la hipótesis nula, mientras que valores de χ^2 menores que aquellos para $p = 0{,}05$ justifican la aceptación de la hipótesis nula. En nuestro caso, un valor de χ^2 de 0,53 para 1 grado de libertad se convierte en un valor de probabilidad entre 0,20 y 0,50. La gráfica (a) proporciona, por interpolación, una estima del valor de *p* de 0,48. En este caso aceptamos la hipótesis nula.

el valor de p indica que, si repitiéramos el experimento muchas veces, en el 26 por ciento de las repeticiones esperaríamos una desviación por azar tan grande o mayor que la observada en la prueba inicial. Por el contrario, el 74 por ciento de las repeticiones mostrarían menos desviación, por azar, que la inicialmente observada.

La discusión anterior de los valores de p indica que una hipótesis (p.e., una proporción 9:3:3:1) nunca se acepta o se rechaza de manera absoluta. En cambio, se debe fijar un límite relativo que sirva de base para rechazar o no la hipótesis nula. Este límite es muy a menudo un valor de p de 0,05. Cuando se aplica al análisis de ji-cuadrado, un valor de p menor a 0,05 significa que la probabilidad de obtener sólo por azar una desviación similar a la observada en el grupo de resultados es menos del 5 por ciento. Tal valor de p indica que la diferencia entre los resultados observados y los esperados es importante y por ello nos permite *rechazar la hipótesis nula*.

Por otro lado, valores de p iguales o mayores a 0,05 (de 0,05 a 1,0) indican que la probabilidad de que la desviación observada sea debida sólo al azar es igual o mayor al 5 por ciento de las veces. En tales casos, *no se rechaza la hipótesis nula*. Así, un valor de $p = 0{,}26$, que valora la hipótesis de que se produce transmisión independiente para explicar los resultados, no se rechaza. Por consiguiente, la desviación observada puede atribuirse razonablemente al azar.

Ahora resuelva esto

En el Problema 3.23 de la página 69 se le pide que aplique el análisis de χ^2 a una serie de datos y que determine si los datos se adecuan a diversas proporciones.

Sugerencia: Al calcular el χ^2, determine primero los resultados esperados utilizando las proporciones previstas. Luego, paso a paso, determine la desviación en cada caso y calcule para cada clase d^2/e.

Aquí es apropiada una consideración final en relación con el caso en el que se rechaza la hipótesis nula, es decir, $p < 0{,}05$. Supongamos, por ejemplo, que la hipótesis nula que estamos comprobando sea que los datos representan una transmisión independiente, que culmina en la proporción 9:3:3:1. Si se rechaza la hipótesis nula, ¿cuál es la interpretación alternativa de los datos? El investigador debe reconsiderar primero las muchas suposiciones que subyacen en la hipótesis nula. En nuestro caso supusimos que la segregación está actuando correctamente para ambos pares de genes. También asumimos, que la fecundación es al azar y que la viabilidad de todos los gametos es igual, independientemente del genotipo —es decir, todos los gametos tienen la misma probabilidad de participar en la fecundación. Finalmente, asumimos que, después de la fecundación, todas las fases preadultas y los descendientes adultos son igualmente viables, independientemente de sus genotipos.

Un ejemplo aclarará esto: supongamos que nuestra hipótesis nula es que un cruce dihíbrido entre moscas de la fruta dará lugar a moscas mutantes sin alas en el 3/16 de las veces (la proporción de zigotos mutantes que de hecho puede darse en la fecundación). Sin embargo, estos embriones mutantes pueden no sobrevivir, ya sea durante el desarrollo larvario o como adultos jóvenes, cuando se les compara con moscas cuyos genotipos dan lugar a alas. Por ello, cuando se recogen los datos, habrá menos moscas sin alas del 3/16. El rechazo de la hipótesis nula no debería ser motivo para rechazar la idea de la validez de la segregación y de la transmisión independiente, ya que otros factores afectan al resultado.

La discusión anterior sirve para señalar que la información estadística debe de analizarse cuidadosamente, caso por caso. Cuando se rechaza una hipótesis nula, deben examinarse todas las suposiciones subyacentes. Si no hay dudas acerca de su validez, entonces se deben considerar otras hipótesis alternativas para explicar los resultados.

¿CÓMO LO SABEMOS?

Al examinar las proporciones genéticas, ¿cómo sabemos si las desviaciones observadas son el resultado del azar o de alguna otra variable que olvidamos para explicar las proporciones esperadas?

3.10 Las genealogías humanas revelan patrones de herencia

Exploraremos ahora cómo determinar el modo de herencia en la especie humana, en donde no es posible programar los cruces y, además, el número de descendientes disponibles para su estudio es relativamente pequeño. El modo tradicional para estudiar la herencia ha sido construir árboles familiares, que indiquen la presencia o ausencia del carácter en cuestión en los miembros de cada generación. Tales árboles familiares se denominan **genealogías**. La Figura 3.13 muestra las convenciones corrientes en genealogías humanas. Analizando una genealogía, podemos predecir como se hereda el gen que estudiamos —por ejemplo, ¿se debe a un alelo dominante o recesivo? Cuando se estudian muchas genealogías para el mismo carácter, a menudo podemos determinar el modo de herencia.

Convenciones en las genealogías

En la Figura 3.13 se muestran las convenciones típicas en una genealogía: los círculos indican a mujeres y los cuadrados a varones. Los padres están unidos por una línea horizontal y una línea vertical conduce a sus descendientes. Si los padres están emparentados (**consanguíneos**), como entre primos hermanos, estarán unidos por una línea doble. Todos los grupos de descendientes son **hermanos** y están conectados por una línea

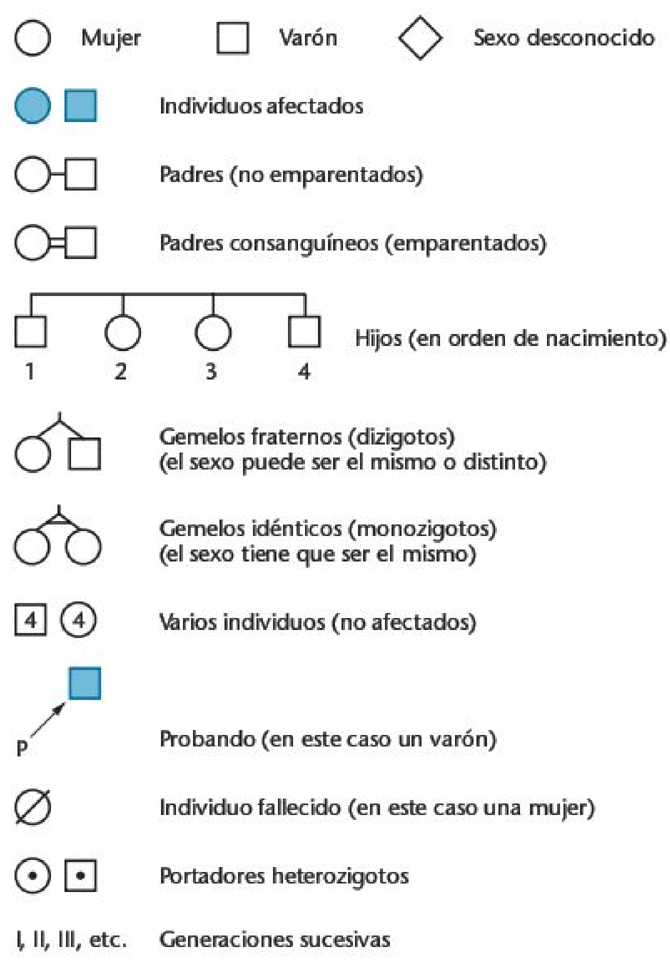


FIGURA 3.13 Convenciones que se encuentran normalmente en genealogías humanas.

horizontal, la **línea de hermanos**. Los hermanos se sitúan de izquierda a derecha de acuerdo con el orden de su nacimiento y se les señala con número arábigos. Cada generación se indica con números romanos. Si el sexo de un individuo es desconocido, se utiliza un rombo. Cuando en una genealogía se estudia un único carácter, los círculos, cuadrados y rombos se sombrean si expresan el fenotipo considerado y no se sombrean en caso contrario. En algunas genealogías, aquellos individuos que no expresan un carácter recesivo, pero que se sabe con certeza que son portadores heterozigotos, llevan un punto negro dentro del círculo o cuadrado no sombreado. Si un individuo ha muerto y se desconoce su fenotipo, se pone una línea diagonal sobre el círculo o cuadrado.

Los gemelos se indican por líneas diagonales que nacen de una línea vertical conectada a la línea de hermanos. Para **gemelos idénticos** (o **monozigotos**), las líneas diagonales están unidas por una línea horizontal. Los **gemelos fraternos** (o **dizigotos**) no tienen esa línea de conexión. Un número dentro de uno de los símbolos representa a numerosos hermanos con los mismos fenotipos o con fenotipos desconocidos. El individuo cuyo fenotipo llamó la atención para la investigación y construcción de la genealogía se llama **probando** y se señala con una flecha con una **p**. Este término se aplica tanto a varones como a mujeres.

Análisis de genealogías

En la Figura 3.14 se presentan dos genealogías. La primera es una genealogía representativa de un carácter con herencia autosómica recesiva, como el albinismo. El padre de la primera generación (I-1) está afectado. Es característico de un carácter recesivo raro con un padre afectado, que el carácter «desaparezca» en los descendientes de la generación siguiente. Asumiendo recesividad, podemos predecir que la madre no afectada (I-2) era una mujer normal, homozigota, ya que ninguno de sus hijos muestra la anomalía. Si ella hubiera sido heterozigota, se esperaría que la mitad de sus hijos manifestasen el albinismo, pero no lo hacen. Sin embargo, una muestra tan pequeña (tres descendientes) impide saberlo con certeza.

Nuevos hechos apoyan la hipótesis de que se trata de un carácter recesivo. Si el albinismo se heredase de manera dominante, el individuo II-3 tendría que expresar el carácter a fin de pasarlo a sus descendientes (III-3 y III-4), pero no lo expresa. La inspección de los descendientes que constituyen la tercera generación (fila III) proporciona un nuevo apoyo a la hipótesis de que el albinismo es un carácter recesivo. Si esto es así, los padres II-3 y II-4 son heterozigotos y aproximadamente la cuarta parte de sus descendientes deberían manifestar el carácter. Dos de los seis descendientes presentan albinismo. Esta desviación, respecto de la proporción esperada, no es inesperada en cruces con pocos descendientes. Una vez que estamos seguros de que el albinismo se hereda como un carácter autosómico recesivo, podríamos señalar a los individuos II-3 y II-4 con un punto negro dentro de su cuadrado y círculo. Finalmente, podemos advertir que una característica de las genealogías para caracteres autosómicos es que tanto varones como mujeres están afectados con igual probabilidad. En el Capítulo 4 examinaremos una genealogía que representa a un gen localizado en el cromosoma X, determinante del sexo. Veremos ciertas limitaciones impuestas en la transmisión de caracteres ligados al X, como que estos caracteres son más prevalentes en los hijos varones y nunca pasan de padres afectados a sus hijos.

La segunda genealogía ilustra el modo de herencia de la enfermedad de Huntington, ocasionada por un alelo autosómico dominante. La clave para identificar genealogías que se refieran a un carácter dominante es que todos los hijos afectados tendrán un padre que también está afectado. Además, si la muestra de descendientes en una generación dada no es muy pequeña, es improbable que el carácter salte una generación, como ocurre en los caracteres recesivos raros. Como en los caracteres recesivos, una vez comprobado que el gen es autosómico, varones y mujeres estarán igualmente afectados.

Cuando en una población las enfermedades autosómicas dominantes son raras, y muchas lo son, entonces es muy poco probable que los individuos afectados hereden una copia del gen mutante de ambos padres. Por consiguiente, en la mayoría de

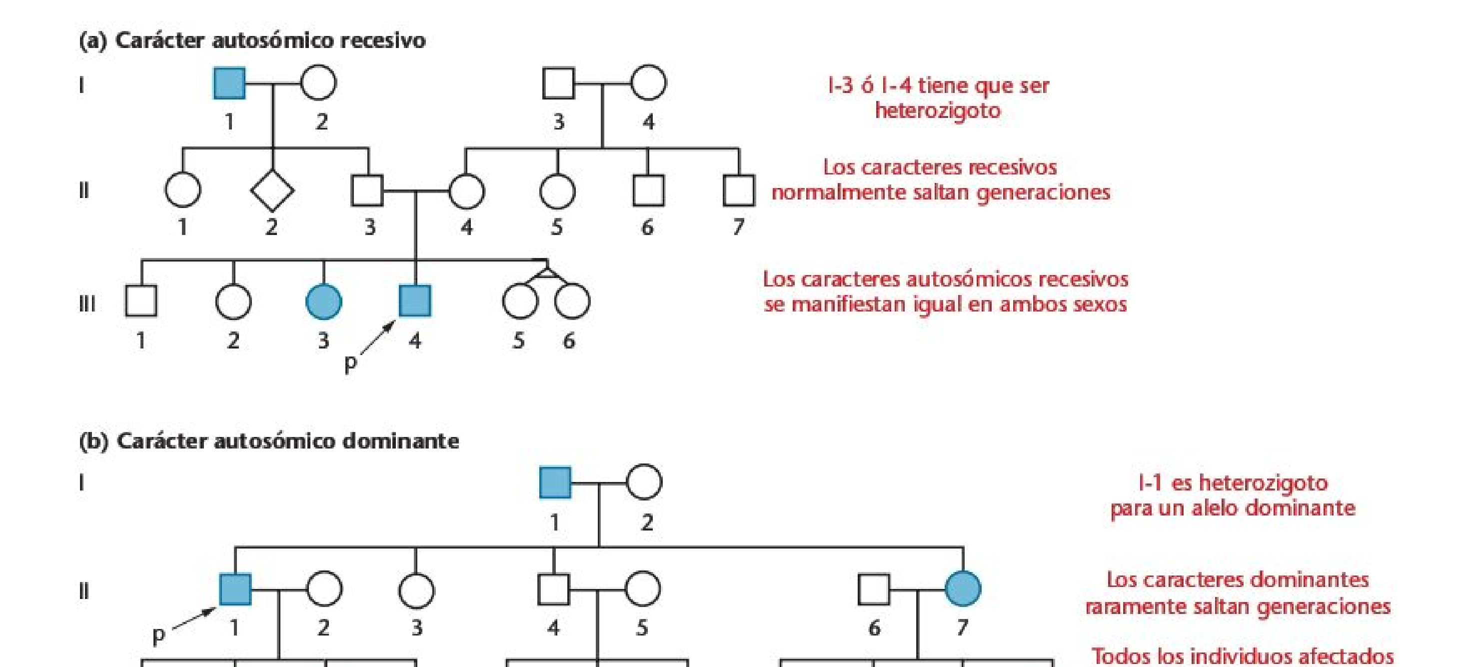


FIGURA 3.14 (a) Genealogía representativa de un carácter autosómico recesivo a lo largo de tres generaciones. (b) Genealogía representativa de un carácter autosómico dominante a lo largo de tres generaciones.

los casos, los individuos afectados serán heterozigotos para el alelo dominante. Por ello, aproximadamente la mitad de los descendientes lo heredarán. Esto se confirma en la segunda genealogía de la Figura 3.14. Además, si una mutación es dominante, y es suficiente una sola copia para dar lugar al fenotipo mutante, es probable que los homozigotos estén incluso más gravemente afectados, quizás incluso no sobrevivan. Un ejemplo de esto es el gen dominante de la **hipercolesterolemia familiar**. Los heterozigotos presentan un defecto en los receptores para las lipoproteínas de baja densidad, las llamadas LDL. Como consecuencia, las células sanguíneas absorben demasiado poco colesterol y por ello se elevan los niveles de LDL en el plasma. Los heterozigotos tienen ataques de corazón a los cuarenta años o antes. Mientras que los heterozigotos tienen niveles de LDL cerca del doble de un individuo normal, en raras ocasiones se han detectado homozigotos. Estos carecen de receptores de LDL y tienen niveles de LDL casi diez veces por encima de lo normal. Probablemente tendrán ataques de corazón muy pronto, incluso antes de los cinco años y casi inevitablemente antes de que lleguen a los 20 años.

El análisis de genealogías de muchos caracteres ha sido, históricamente, una técnica de investigación muy valiosa en estudios de genética humana. Sin embargo, este enfoque no ha proporcionado normalmente la certeza que se obtiene al deducir conclusiones a partir de cruces planeados para obtener gran número de descendientes. No obstante, cuando se analizan muchas genealogías independientes para el mismo carácter o trastorno, a menudo se pueden deducir conclusiones consistentes. En la Tabla 3.4 se da una lista de muchos caracteres humanos, clasificados de acuerdo con su expresión dominante o recesiva. Los genes que controlan algunos de esos caracteres están localizados en los cromosomas que determinan el sexo. En el Capítulo 4 discutiremos genealogías para caracteres ligados al X.

Ahora resuelva esto

En el Problema 3.27 de la página 69 se le pide que examine una genealogía para la miopía y que prediga si el carácter es dominante o recesivo.

Sugerencia: Una de las primeras cosas que hay que buscar son los individuos que expresen el carácter, pero cuyos padres no lo expresen. Tal observación hace muy improbable que el carácter sea dominante.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo determinan los genéticos en la especie humana si un carácter hereditario depende de un alelo recesivo o dominante?

TABLA 3.4 **CARACTERES RECESIVOS Y DOMINANTES MÁS REPRESENTATIVOS EN LA ESPECIE HUMANA**

Caracteres recesivos	Caracteres dominantes
Albinismo	Acondroplasia
Alcaptonuria	Braquidactilia
Anemia falciforme	Ceguera noctura estacional congénita
Ataxia telagientacsia	Enfermedad de Huntington
Ceguera para los colores	Gustación de la Feniltiocarbamida
Distrofia muscular de Duchenne	Hipercolesterolemia
Enfermedad de Tay-Sachs	Hipotricosis
Fenilcetonuria	Neurofibromatosis
Fibrosis quística	Pico de viuda
Galactosemia	Porfiria (algunas formas)
Hemofilia	Síndrome de Ehler-Danlos
Síndrome de Lesch-Nyhan	Sindrome de Marfan





GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

La enfermedad de Tay-Sachs: un trastorno molecular recesivo en la especie humana

La enfermedad de Tay-Sachs[4] (TSD) es una anomalía autosómica recesiva que da lugar a una degeneración progresiva del sistema nervioso central. Los bebes con TSD parecen normales al nacer y parece que se desarrollan normalmente hasta los seis meses, perdiendo luego gradualmente sus capacidades físicas y mentales. Los bebes afectados quedan ciegos, sordos, mentalmente retrasados y paralizados sólo en uno o dos años y la mayoría no pasa más allá de los cinco años. Recibe el nombre de los primeros que describieron los síntomas y los relacionaron con la enfermedad hacia finales del siglo XIX, Warren Tay y Bernard Sachs. La enfermedad de Tay-Sachs se produce como consecuencia de la pérdida de actividad de la enzima hexosaminidasa A (Hex-A). Esta enzima se encuentra normalmente en los lisosomas, orgánulos que degradan moléculas grandes para reciclarlas para la célula. La Hex-A se necesita para degradar el gangliósido GM2, un componente lipídico de las membranas de las células nerviosas. Sin Hex-A funcional, los gangliósidos se acumulan en las células cerebrales y dan lugar al deterioro del sistema nervioso. Los portadores heterozigotos para la TSD, con una copia normal del gen, producen sólo la mitad de la cantidad normal de Hex-A, pero no manifiestan síntomas de la enfermedad.

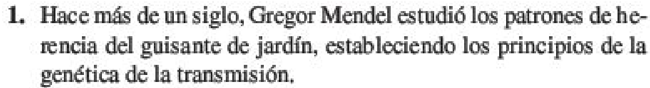
El gen responsable de la enfermedad de Tay-Sachs se encuentra en el cromosoma 15 y codifica para la subunidad alfa de la enzima Hex-A. Desde que se aisló el gen en 1985, se han identificado más de 50 mutaciones distintas que dan lugar a la TSD. Aunque la forma más corriente de la enfermedad es la infantil, en donde no se produce Hex-A funcional, hay también una forma rara de aparición tardía que se da en pacientes con una actividad muy reducida de la Hex-A. La TSD de aparición tardía no es detectable hasta que los pacientes tienen veinte o treinta años y en general es mucho menos grave que la forma infantil. Entre los síntomas se da temblor de las manos, defectos del habla, debilidad muscular y pérdida del equilibrio.

La enfermedad de Tay-Sachs es casi un centenar de veces más frecuente en los judíos Ashkenazi —descendientes de judíos de Europa central y oriental— que en la población general y también hay gran incidencia en canadienses franceses y en miembros de la población Cajun de Luisiana. En los Estados Unidos, aproximadamente uno de cada 27 judíos Ashkenazi son portadores de la TSD. Por el contrario, la tasa de portadores en la población general y en judíos de origen sefardí (españoles o portugueses) es aproximadamente de uno cada 250. Aunque actualmente no hay tratamientos efectivos para la TSD, avances recientes en la detección de portadores ha ayudado a reducir la prevalencia de la enfermedad en poblaciones de alto riesgo. Los portadores se pueden identificar mediante pruebas de la actividad de la Hex-A o mediante prueba de DNA que detecten mutaciones génicas concretas. Además, actualmente se están investigando inhibidores de la síntesis de gangliósidos y terapias de sustitución de la enzima Hex-A como tratamientos potenciales para la enfermedad de Tay-Sachs.

Referencias

Fernández, F. and Shapiro, B. 2004. Tay-Sachs Disease. Arch. Neurol. 61:1466-68.

[4] *Nota del traductor:* idiocia amaurótica familiar.



1. Hace más de un siglo, Gregor Mendel estudió los patrones de herencia del guisante de jardín, estableciendo los principios de la genética de la transmisión.
2. Los principios de Mendel nos ayudan a describir las bases de la herencia de la expresión fenotípica. Demostró que unos factores, llamados más tarde alelos, se encontraban en parejas y presentaban relaciones de dominancia/recesividad al determinar la expresión de los caracteres.
3. Mendel postuló que los factores deben segregar en la formación de los gametos, de tal manera que cada gameto recibe sólo uno de los dos factores con igual probabilidad.
4. El principio de Mendel de la transmisión independiente plantea que cada par de factores segrega independientemente de cualquier otro par. Por ello, se formarán todas las combinaciones posibles de gametos con igual probabilidad.
5. Mendel diseñó el cruce prueba para determinar el genotipo de guisantes que expresan caracteres dominantes.
6. El descubrimiento de los cromosomas hacia finales del siglo XIX, y los estudios posteriores sobre su comportamiento en la meiosis, condujeron al renacimiento del trabajo de Mendel, relacionando el comportamiento de sus factores con el de los cromosomas en la meiosis.
7. Para predecir la probabilidad de los fenotipos y de los genotipos en cruces para dos o más pares de genes, se utiliza el tablero de Punnett y el método de la bifurcación en línea.
8. Las proporciones genéticas se expresan como probabilidades. Así, los resultados derivados de cruces genéticos descansan en la comprensión de las leyes de la probabilidad, especialmente la ley de la suma, la ley del producto, la probabilidad condicional y el uso del teorema binomial.
9. En genética, se pueden prever variaciones de las proporciones esperadas debido a desviaciones al azar. El análisis estadístico se utiliza para comprobar la validez de los resultados experimentales.
10. El análisis de ji-cuadrado nos permite comprobar la hipótesis nula; es decir, que no hay diferencias reales entre los valores observados y esperados. Con él se comprueba la probabilidad de si las variaciones observadas se pueden atribuir a desviaciones por azar.
11. El análisis de genealogías proporciona un método para estudiar los patrones de herencia de caracteres en la especie humana a lo largo de varias generaciones. Tal análisis proporciona a menudo las bases para determinar el modo de herencia de enfermedades y caracteres humanos.

IDEAS Y SOLUCIONES

Como estudiante, se le pedirá que demuestre su conocimiento de la genética de la transmisión resolviendo problemas de genética. El éxito en esta tarea requiere no solo la comprensión de la teoría, sino también su aplicación a situaciones genéticas más prácticas. Muchos estudiantes encuentran que la resolución de los problemas de genética es un desafío, pero también un premio. Esta sección está diseñada para proporcionar ideas básicas en el razonamiento esencial para este proceso.

Los problemas de genética son en muchos aspectos similares a los problemas algebraicos de palabras. El enfoque que hay que tomar es idéntico: (1) analizar el problema cuidadosamente; (2) traducir las palabras en símbolos, definiendo primero cada uno; y (3) elegir y aplicar una técnica específica para resolver el problema. Los primeros dos pasos son los más importantes. El tercer paso es en gran medida mecánico.

Los problemas más simples son aquellos que presentan toda la información necesaria acerca de la generación P_1 y le pide encontrar las proporciones esperadas de los genotipos y/o fenotipos de las F_1 y F_2. Cuando encuentre un problema de este tipo, debería de seguir siempre los siguientes pasos.

a) Determinar tan pronto como sea posible los genotipos de los individuos de la generación P_1.

b) Determinar qué gametos pueden formar los padres P_1.

c) Combinar gametos, bien por el método del tablero de Punnett, por el método de la bifurcación en línea o, si la situación es muy simple, por inspección. Lea los fenotipos F_1 directamente.

d) Repetir el proceso para obtener información de la generación F_2.

Ejecutar los pasos mencionados más arriba requiere la comprensión de las bases teóricas de la genética de la transmisión. Por ejemplo, consideremos el siguiente problema:

En *Drosophila melanogaster*, un alelo mutante recesivo, *black** (negro), da lugar en homozigosis a un cuerpo muy oscuro. El color normal del tipo silvestre es gris. Si una hembra *black* se cruza con un macho gris, cuyo padre era *black*, ¿qué proporción fenotípica se esperaría en F_1?

Para resolver este problema hay que entender los conceptos de dominancia y recesividad, así como el principio de la segregación. Además, hay que utilizar la información sobre el padre del macho. Una manera de resolver el problema es:

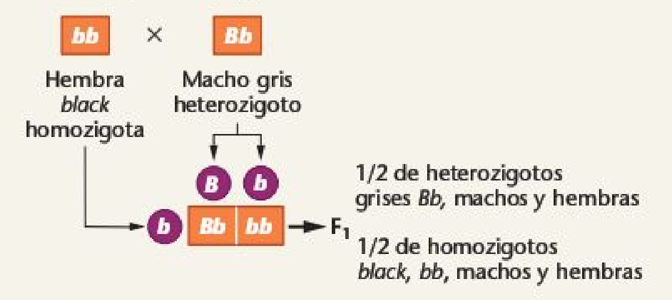
a) Debido a que la hembra materna es *black*, tiene que ser homozigota para el alelo mutante (*bb*).

b) El macho paterno es gris; por consiguiente tiene que tener al menos un alelo dominante (*B*). Debido a que su padre era *black*

* *Nota del traductor*: los nombre de los mutantes de *Drosophila*, y en general de muchos otros organismos, no se traducen del idioma en el que fueron descritos, del inglés en este caso.

(*bb*) y que el macho paterno recibió uno de los cromosomas portadores de dicho alelo, tiene que ser heterozigoto (*Bb*).

Por ello, resolver el problema es directo:



Aplique el enfoque que acabamos de explicar a los siguientes problemas.

1. En el trabajo de Mendel con guisantes, encontró que las vainas hinchadas eran dominantes respecto de las arrugadas, mientras que las semillas redondas eran dominantes sobre las rugosas. Uno de sus cruces fue entre plantas hinchadas y redondas con plantas arrugadas y rugosas. De este cruce obtuvo una F_1 que fue toda ella hinchada y redonda. En F_2 Mendel obtuvo su proporción clásica 9:3:3:1. Utilizando la información precedente determine los resultados esperados en F_1 y F_2 de un cruce entre plantas homozigotas arrugadas y redondas con hinchadas y rugosas.

Solución: Primero, defina los símbolos de los genes de cada par de caracteres alternativos. Seleccione, en letra minúscula, la primera letra del carácter recesivo para designar a estos caracteres, y utilice la letra mayúscula para designar a los caracteres dominantes. Por ejemplo, utilice *A* y *a* para indicar los fenotipos hinchado y arrugado, y *R* y *r* para redondo y rugoso, respectivamente.

Ahora determine los genotipos de la generación P_1, forme los gametos, reconstruya la generación F_1 y determine los fenotipos de F_1:

P_1	*aaRR* arrugado, redondo	×	*AArr* hinchado, rugoso
	↓		↓
Gametos	*aR*		*Ar*
F_1		*AaRr* hinchado, redondo	

Se puede ver enseguida que la generación F_1 expresa ambos fenotipos dominantes y es heterozigota para ambos pares de genes. Podemos esperar que la generación F_2 dé lugar a la clásica proporción mendeliana 9:3:3:1. De todos modos, desarrollemos esto, sólo para confirmarlo, utilizando el método de la bifurcación en línea. Debido a que ambos pares de genes son heterozigotos y que puede esperarse que se transmitan independientemente, podemos predecir los resultados de F_2 separadamente para cada par de genes y luego seguir con el método de la bifurcación en línea.

Cada descendiente de F_2 está sujeto a las siguientes probabilidades:

$Aa \times Aa$		$Rr \times Rr$	
↓		↓	
AA, *Aa*, *aA*	hinchado	*RR*, *Rr*, *rR*	redondo
aa	arrugado	*rr*	rugoso

El método de la bifuración en línea nos permite confirmar la proporción fenotípica 9:3:3:1. Recuerde que ésta representa la proporción 9/16:3/16:3/16:1/16. Advierta que estamos aplicando la ley del producto cuando calculamos la probabilidad final:

3/4 hinchado
- 3/4 redondo $\xrightarrow{(3/4)(3/4)}$ 9/16 hinchado, redondo
- 1/4 rugoso $\xrightarrow{(3/4)(1/4)}$ 3/16 hinchado, rugoso

1/4 arrugado
- 3/4 redondo $\xrightarrow{(1/4)(3/4)}$ 3/16 arrugado, redondo
- 1/4 rugoso $\xrightarrow{(1/4)(1/4)}$ 1/16 arrugado, rugoso

2. Determine la probabilidad de que, a partir de plantas paternas de genotipos *AaRr* y *Aarr*, se produzca una planta de genotipo *AaRr*.

Solución: debido a que los dos pares de genes se transmiten independientemente en la formación de los gametos, sólo necesitamos calcular la probabilidad de cada uno de los dos sucesos por separado (*Aa* y *Rr*) y aplicar la ley del producto para calcular la probabilidad final:

$$Aa \times Aa \rightarrow 1/4\ AA{:}1/2\ Aa{:}1/4\ aa$$

$$Rr \times rr \rightarrow 1/2\ Rr{:}1/2\ rr$$

$$p = (1/2\ Aa)(1/2\ Rr) = 1/4\ AaRr$$

3. En otro cruce entre dos plantas paternas de genotipo y fenotipos desconocidos, se obtuvieron los descendientes siguientes.

3/8 hinchado, redondo
3/8 hinchado, rugoso
1/8 arrugado, redondo
1/8 arrugado, rugoso

Determine el genotipo y el fenotipo de los padres.

Solución: Este problema es más difícil y requiere un ingenio más agudo, ya que se debe ir hacia atrás. El mejor planteamiento es considerar los resultados de la forma de la vaina independientemente de los de la textura de la semilla.

De todas las plantas, 6/8 (3/4) son hinchadas y 2/8(1/4) son arrugadas. De las distintas combinaciones genotípicas que nos pueden servir de padres, ¿cuál dará una proporción 3/4:1/4? Debido a que esta razón es idéntica al resultado en F_2 del monohibridismo, podemos proponer que ambos padres desconocidos comparten las mismas características genéticas que los padres F_1 del monohibridismo. Ambos deben ser heterozigotos para el gen que controla la forma de la vaina y por ello son

$$Aa$$

Antes de aceptar esta hipótesis consideremos las combinaciones genotípicas posibles que controlan la textura de la semilla. Si consideramos esta característica por separado, podemos ver que los caracteres se encuentran en la proporción 4/8 (1/2) redondas:4/8(1/2) rugosas. A fin de obtener tal proporción, los padres *no pueden* ser ambos heterozigotos, ya que entonces sus descendientes se encontrarían en la proporción fenotípica 3/4:1/4. *Tampoco pueden ser* ambos homozigotos, ya que entonces todos los descendientes manifestarían un único fenotipo. Por ello, tenemos que comprobar la

hipótesis de que un padre sea homozigoto y el otro heterozigoto para los alelos que controlan la textura. El caso posible $RR \times Rr$ no funcionará, ya que también produce un único fenotipo. Esto nos lleva al caso posible $Rr \times rr$. Los descendientes de tal cruce estarán en la proporción 1/2 *Rr* (redonda):1/2 *rr* (rugosa), exactamente el resultado que observamos.

Combinemos ahora nuestras hipótesis y predigamos el resultado del cruce. En nuestra solución, utilizaremos un guión (−) para indicar que el segundo alelo puede ser o dominante o recesivo:

3/4 *A*−
- 1/2 *Rr* → 3/8 *A*−*Rr* hinchado, redondo
- 1/2 *rr* → 3/8 *A*−*rr* hinchado, rugoso

3/4 *aa*
- 1/2 *Rr* → 1/8 *aaRr* arrugado, redondo
- 1/2 *rr* → 1/2 *rr* arrugado, rugoso

Como se puede ver, este cruce da lugar a descendientes de acuerdo con la información proporcionada, resolviéndose así el problema. Adviértase que en esta solución hemos utilizado los *genotipos* en el método de la bifurcación en línea, en contraste con la utilización de los *fenotipos* en la solución del primer problema.

4. En el laboratorio, una estudiante de genética cruzó moscas con alas largas normales con moscas con alas mutantes *dumpy* (regordetas), que creía que era un carácter recesivo. En la F_1 todas las moscas tenían alas largas. En la F_2 se obtuvieron los siguientes resultados:

792 moscas con alas largas
y
208 moscas con alas *dumpy*

La estudiante comprobó la hipótesis de que las alas *dumpy* se heredaran como un carácter recesivo realizando un análisis de χ^2 de los datos de F_2.

(a) ¿Qué proporción propuso la estudiante?
(b) ¿Apoyó el análisis de χ^2 la hipótesis?
(c) ¿Qué sugieren los datos acerca de la mutación *dumpy*?

Solución:

(a) La estudiante propuso la hipótesis de que los datos de F_2 (792:208) encajaban con la proporción mendeliana de monohíbridismo 3:1 para genes recesivos.
(b) El paso inicial en el análisis de χ^2 es calcular los resultados esperados (*e*) suponiendo la proporción 3:1. Luego se calculan las desviaciones (*d*) entre los valores observados (los datos reales) y los esperados.

Proporción	*o*	*e*	*d*	d^2	d^2/e
3/4	792	750	42	1.764	2,35
1/4	208	250	− 42	1.764	7,06
Total = 1.000					

$$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{e}$$
$$= 2{,}35 + 7{,}06$$
$$= 9{,}41$$

Consultando la Figura 3.12 podemos calcular la probabilidad (*p*). Este valor nos permitirá determinar si las desviaciones respecto de la hipótesis nula se pueden atribuir al azar. Hay dos posibles resultados (*n*), por lo que los grados de libertad son (gl) $= n - 1 = 1$. La tabla de la Figura 3.12 muestra que $p = 0{,}01$ a 0,001. El gráfico da una estima alrededor de 0,001. Ya que *p* es menor a 0,05 nos obliga a rechazar la hipótesis nula. Los datos no concuerdan estadísticamente con la proporción 3:1.

Cuando aceptamos la proporción mendeliana 3:1 como expresión válida de un cruce monohíbrido, hicimos numerosas suposiciones. Una de ellas puede explicar porqué se rechazó la hipótesis nula. Tuvimos que asumir que *todos los genotipos eran igualmente viables*. Es decir, en el momento de la recogida de datos, los genotipos que dan lugar a alas largas tienen igual probabilidad de sobrevivir desde la fecundación hasta el estado adulto que los genotipos que producen alas *dumpy*. Un estudio más detallado revelaría que las moscas *dumpy* son algo menos viables que las moscas normales. Por ello, esperaríamos que *menos* de 1/4 del total de los descendientes expresen el carácter *dumpy*. Esta observación se deduce de los datos, aunque no lo hemos probado.

5. Si dos padres, ambos portadores heterozigotos de un gen autosómico recesivo para la fibrosis quística, tienen cinco hijos, ¿cuál es la probabilidad de que tres sean normales?

Solución: Primero, la probabilidad de tener un hijo normal en cada embarazo es

$$p_a = \text{normal} = 3/4$$

Mientras que la probabilidad de tener un hijo afectado es

$$p_b = \text{afectado} = 1/4$$

Aplicando la fórmula, tenemos

$$\frac{n!}{s!t!}a^s b^t$$

en donde $n = 5$, $s = 3$ y $t = 2$

$$p = \frac{(5)\cdot(4)\cdot(3)\cdot(2)\cdot(1)}{(3)\cdot(2)\cdot(1)\cdot(2)\cdot(1)}(3/4)^3(1/4)^2$$

$$= \frac{(5)\cdot(4)}{(2)\cdot(1)}(3/4)^3(1/4)^2$$

$$= 10(27/64)\cdot(1/16)$$

$$= 10(27/1024)$$

$$= 270/1024$$

$$p = \sim 0.26$$

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

Cuando resuelva problemas de genética en éste y en capítulos sucesivos, asuma siempre que los miembros de la generación P_1 son homozigotos, a menos que la información dada, o los datos presentados, indique o requiera lo contrario.

1. En un cruce entre una cobaya negra y una blanca, todos los individuos de la generación F_1 son negros. La generación F_2 está formada aproximadamente por 3/4 de cobayas negras y 1/4 blancas.
   (a) Haga un esquema del cruce, mostrando los genotipos y fenotipos.
   (b) Si se cruzan dos cobayas blancas de la F_2, ¿a quien se parecerán los descendientes?
   (c) Se hicieron dos cruces diferentes entre cobayas negras de la generación F_2, con los resultados que se muestran a continuación.

Cruce	Descendientes
Cruce 1	Todos negros
Cruce 2	3/4 negros, 1/4 blancos

   Haga un esquema de cada uno de los cruces.

2. En la especie humana el albinismo se hereda como un carácter recesivo simple. Para las siguientes familias determine los genotipos de los padres y de los descendientes. (Cuando existan dos genotipos alternativos posibles, indique ambos.)
   (a) Dos padres normales tienen cinco hijos, cuatro normales y uno albino.
   (b) Un varón normal y una mujer albina tienen seis hijos, todos normales.
   (c) Un varón normal y una mujer albina tienen seis hijos, tres normales y tres albinos.
   (d) Dibuje la genealogía de las familias (b) y (c). Suponga que uno de los hijos normales de (b) se casa con un hijo albino de (c) y que tienen ocho hijos. Amplíe la genealogía para incluirlos, prediciendo sus fenotipos (normal o albino).

3. ¿Qué postulado de Mendel se ilustra en la genealogía del Problema 2? Haga una lista y defina estos postulados.
4. Discuta cómo los resultados monohíbridos de Mendel sirven de base a todos excepto a uno de sus postulados. ¿Qué postulado no se basa en estos resultados? ¿Por qué?
5. ¿Qué ventajas le proporcionó a Mendel la elección del guisante de jardín para sus experimentos?
6. Las palomas pueden presentar un patrón ajedrezado o liso. En una serie de cruces controlados, se obtuvieron los siguientes datos:

	Descendencia F_1	
Cruce P_1	Ajedrezados	Lisos
(a) ajedrezado × ajedrezado	36	0
(b) ajedrezado × liso	38	0
(c) liso × liso	0	35

   Luego, los descendientes F_1 se cruzaron selectivamente, con los siguientes resultados. (Entre paréntesis se indica el cruce P_1, que dio lugar a los pichones F_1.)

	Descendencia F_2	
Cruces $F_1 \times F_1$	Ajedrezados	Lisos
(d) ajedrezado (a) × liso (c)	34	0
(e) ajedrezado (b) × liso (c)	17	14
(f) ajedrezado (b) × ajedrezado (b)	28	9
(g) ajedrezado (a) × ajedrezado (b)	39	0

   ¿Cómo se heredan los patrones ajedrezado y liso? Seleccione y defina los símbolos para los genes implicados y determine los genotipos de los padres y de los descendientes en cada cruce.

7. Mendel cruzó guisantes que tenían semillas redondas y cotiledones amarillos (las cubiertas de las semillas) con guisantes que tenían semillas rugosas y cotiledones verdes. Todas las plantas F_1 tenían semillas redondas y cotiledones amarillos. Esquematice el cruce hasta la generación F_2 utilizando tanto el método del tablero de Punnett como el esquema de la bifurcación en línea o ramificado.
8. Basándose en la generación F_2 del cruce anterior, ¿cuál es la probabilidad de que un organismo tenga semillas redondas y cotiledones verdes y sea raza pura?
9. Basándose en los mismos caracteres del Problema 7, determine los genotipos de las plantas paternas implicadas en los cruces que se muestran a continuación, mediante el análisis de los fenotipos de sus descendientes.

Plantas paternas	Descendientes
(a) redonda, amarilla × redonda, amarilla	3/4 redondas, amarillas 1/4 rugosas, amarillas
(b) rugosa, amarilla × redonda, amarilla	6/16 rugosas, amarillas 2/16 rugosas, verdes 6/16 redondas, amarillas 2/16 redondas, verdes
(c) redonda, amarilla × redonda, amarilla	9/16 redondas, amarillas 3/16 redondas, verdes 3/16 rugosas, amarillas 1/16 rugosas, verdes
(d) redonda, amarilla × rugosa, verde	1/4 redondas, amarillas 1/4 redondas, verdes 1/4 rugosas, amarillas 1/4 rugosas, verdes

10. ¿Hay algún cruce del Problema 9 que es un cruce prueba? Si es así, ¿cuál de ellos?
11. ¿Cuál de los postulados de Mendel puede demostrarse únicamente en cruces en los que están implicados al menos dos pares de caracteres? Defina el postulado.

12. Correlacione los cuatro postulados de Mendel con lo que se sabe ahora sobre los cromosomas homólogos, los genes, los alelos y la meiosis.

13. ¿Cuál es la base para la homología entre los cromosomas?

14. Distinga entre homozigosis y heterozigosis.

15. En *Drosophila*, el color *gris* del cuerpo es dominante sobre el color *ebony* (ebano), mientras que las alas *largas* son dominantes sobre las alas *vestigial* (vestigiales). Suponiendo que los individuos P_1 son homozigotos, resuelva los siguientes cruces hasta la generación F_2 y determine las proporciones genotípicas y fenotípicas en cada generación.

(a) gris, largas × ebano, vestigiales
(b) gris, vestigiales × ebano, largas
(c) gris, largas × gris, vestigiales

16. ¿Cuántos tipos diferentes de gametos se pueden formar por individuos con los siguientes genotipos: (a) *AaBb*, (b) *AaBB*, (c) *AaBbCc*, (d) *AaBBCc*, (e) *AaBbcc* y (f) *AaBbCcDdEe*? ¿Cuáles son en cada caso?

17. Usando el método de la bifurcación en línea, o esquema ramificado, determine las proporciones genotípicas y fenotípicas de los cruces trihíbridos: (a) *AaBbCc* × *AaBBCC*, (b) *AaBBCc* × *aaBBCc* y (c) *AaBbCc* × *AaBbCc*.

18. Mendel cruzó guisantes con semillas verdes con guisantes con semillas amarillas. La generación F_1 produjo sólo semillas amarillas. En las 258 plantas de la generación F_2, encontró 6.022 semillas amarillas y 2.001 semillas verdes. De 519 semillas amarillas de F_2 obtuvo plantas que dejo que se autofecundaran, con los siguientes resultados: 166 se comportaron como raza pura para amarillo y 353 dieron lugar a una proporción 3:1 de semillas amarillas y verdes, respectivamente. Explicar estos resultados haciendo un esquema de los cruces.

19. En un estudio de cobayas negras y blancas, se cruzaron individualmente 100 cobayas negras con blancas y de cada cruce se obtuvo una generación F_2. En 94 de los casos, los individuos de F_1 eran todos negros y la proporción en F_2 fue de 3 negros:1 blanco. En los otros 6 casos, la mitad de los animales de F_1 eran negros y la otra mitad blancos. ¿Por qué? Prediga los resultados del cruce entre cobayas F_1 negras y blancas de estos 6 casos excepcionales.

20. Mendel cruzó guisantes con semillas redondas y verdes con otros con semillas rugosas y amarillas. Todas las plantas de F_1 tenían semillas redondas y amarillas. Prediga los resultados de un cruce prueba de estas plantas F_1.

21. La talasemia es un trastorno hereditario en la especie humana que produce anemia. Los individuos afectados presentan una anemia «minor» o una anemia «major». Asumiendo que en la herencia de este trastorno está implicado un solo gen con dos alelos, ¿es la talasemia un trastorno dominante o recesivo?

22. A continuación se muestran los resultados de dos cruces monohíbridos de Mendel.

(a)	Vainas hinchadas	882
	Vainas arrugadas	299
(b)	Flores violeta	705
	Flores blancas	224

Establezca una hipótesis nula para comprobarlos, utilizando el análisis de χ^2. Calcule el valor de χ^2 y determine el valor de *p* para ambos cruces. Interprete los valores de *p*. Las desviaciones ¿pueden atribuirse en cada caso al azar o no? ¿Cuál de los dos cruces muestra una mayor desviación?

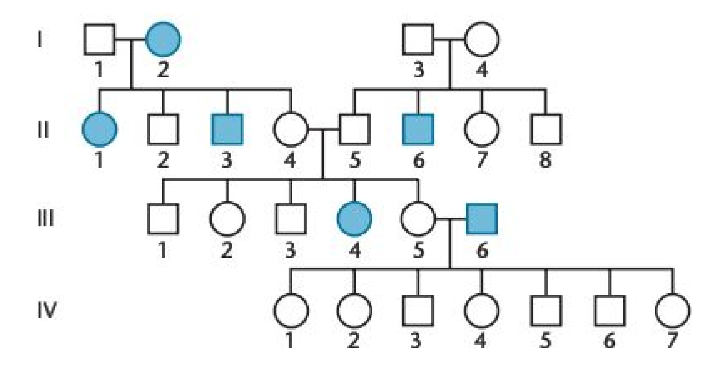
23. En uno de los cruces dihíbridos, Mendel observó entre las semillas F_2, 315 redondas y amarillas, 108 redondas y verdes, 101 rugosas y amarillas y 32 rugosas y verdes. Analice estos datos utilizando la prueba de χ^2 para comprobar si

(a) los datos están de acuerdo con la proporción 9:3:3:1.
(b) los datos sobre semillas redondas y rugosas están de acuerdo con la proporción 3:1.
(c) los datos sobre semillas amarillas y verdes están de acuerdo con la proporción 3:1.

24. Una investigadora, al comprobar datos que se distribuían en dos clases fenotípicas, observó valores de 250:150. Decidió realizar un análisis de χ^2 utilizando dos hipótesis nulas diferentes: (a) los datos se adecuan a la proporción 3:1 y (b) los datos se adecuan a la proporción 1:1. Calcule los valores de χ^2 para cada hipótesis. ¿Qué se puede concluir en cada caso?

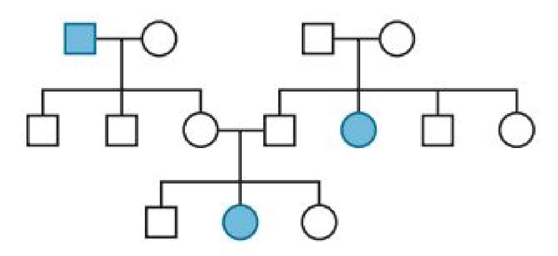
25. La base para rechazar cualquier hipótesis nula es arbitraria. El investigador puede ser más o menos estricto en cuanto a decidir elevar o bajar los valores de *p* utilizados para rechazar o admitir la hipótesis. En el caso del análisis de ji-cuadrado de cruces genéticos, ¿el uso de un nivel de $p = 0{,}10$ es más o menos estricto a la hora de rechazar o aceptar la hipótesis nula? Explíquelo.

26. Considere la siguiente genealogía



Prediga el modo de herencia y los genotipos más probables de cada individuo. Asuma que los alelos *A* y *a* controlan la expresión del carácter.

27. La siguiente genealogía se refiere a la miopía humana.



Prediga si esta anomalía se hereda como un carácter dominante o recesivo. Determine los genotipos más probables para cada individuo basándose en su predicción.

28. Considere tres pares de genes que se transmiten independientemente, *A/a*, *B/b* y *C/c*. ¿Cuál es la probabilidad de obtener un descendiente *AABbCc* a partir de padres *AaBbCC* y *AABbCc*?

29. ¿Cuál es la probabilidad de obtener un individuo triple recesivo a partir de los padres del Problema 28?

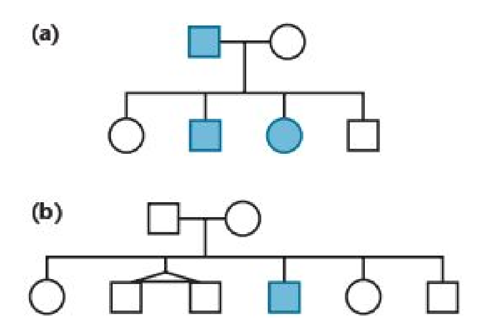
30. De todos los descendientes de los padres del Problema 28, ¿qué proporción expresará los tres caracteres dominantes?

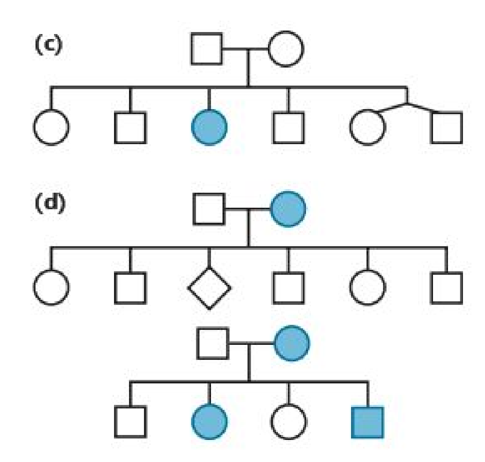
31. Cuando se tira un dado, hay la misma probabilidad de que aterrice en cualquiera de sus seis caras.

(a) ¿Cuál es la probabilidad de sacar un 3 con una sola tirada?
(b) Cuando un dado se tira dos veces, ¿cuál es la probabilidad de que en la primera tirada salga 3 y en la segunda 6?
(c) Cuando un dado se tira dos veces, ¿cuál es la probabilidad de que en una tirada salga 3 y en la otra 6?
(d) Si se tiran dos dados juntos, ¿cuál es la probabilidad de que en uno salga 3 y en el otro salga 6?
(e) Si se tira un dado y sale un número impar, ¿cuál es la probabilidad de que sea 5?

32. Considere los descendientes F_2 de un cruce dihíbrido mendeliano. Determine la probabilidad condicional de que las plantas F_2 que expresan ambos caracteres dominantes sean heterozigotas para ambos loci.

33. Saque todas las conclusiones posibles en cuanto al modo de herencia del carácter indicado en cada una de las siguientes pequeñas genealogías (cada caso se basa en un carácter diferente).





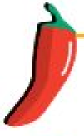
34. La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva. Un varón, cuyo hermano padecía la enfermedad, se casa con una mujer, cuya hermana tenía la enfermedad. No se sabe si estos individuos son portadores. Si tienen un hijo, ¿cuál es la probabilidad de que el hijo tenga la fibrosis quística?

35. En una familia de cinco hijos, ¿cuál es la probabilidad de que

(a) todos sean varones?
(b) tres sean varones y dos mujeres?
(c) dos sean varones y tres mujeres?
(d) todos tengan el mismo sexo?

Suponga que la probabilidad de un hijo es la misma que la probabilidad de una hija ($p = 1/2$)

36. En una familia de ocho hijos, en donde ambos padres son heterozigotos para el albinismo, ¿qué expresión matemática predice la probabilidad de que seis sean normales y dos albinos?



Problemas extra-picantes

37. Se cruzan dos plantas de guisante, que son raza pura. Un padre es redondo, terminal, violeta y arrugado, mientras que el otro expresa los fenotipos alternativos, rugoso, axial, blanco e hinchado. Los cuatro pares de caracteres alternativos están regulados por cuatro genes, localizado cada uno de ellos en cromosomas distintos. En F_1 sólo se expresaron los caracteres redondo, axial, violeta e hinchado. En F_2 se expresaron todas las posibles combinaciones de estos caracteres de acuerdo con la herencia mendeliana.

(a) ¿A qué conclusiones podemos llegar acerca de la herencia de estos caracteres, basándonos en los resultados de F_1?
(b) En los resultados de F_2, ¿qué fenotipo aparecerá con mayor frecuencia? Escriba una expresión matemática que prediga la probabilidad de aparición de dicho fenotipo.
(c) En los resultados de F_2, ¿qué fenotipo aparecerá con menor frecuencia? Escriba una expresión matemática que prediga esta probabilidad.
(d) En la generación F_2, ¿con qué probabilidad aparecerá cualquiera de los fenotipos de P_1?
(e) Si se hiciera un cruce prueba con las plantas F_1, ¿cuántos fenotipos diferentes aparecerían? ¿Cómo se puede comparar dicho número con el número de fenotipos diferentes de la generación F_2 que se discutió antes?

38. La enfermedad de Tay-Sachs (TSD) es un error congénito del metabolismo que a menudo ocasiona la muerte a la edad de dos años. Suponga que es consejero genético y un día entrevista a una pareja fenotípicamente normal, en donde el varón tuvo una prima hermana (por parte de su padre) que murió de TSD, y en donde la mujer tuvo un tío materno con TSD. No hay ningún otro caso conocido en ninguna de las dos familias y ninguno de los casamientos se realizó entre individuos emparentados. Suponga que este carácter es muy raro.

(a) Dibuje la genealogía de las familias de esta pareja, señalando a los individuos relevantes.
(b) Calcule la probabilidad de que tanto el varón como la mujer sean portadores de TSD.
(c) ¿Cuál es la probabilidad de que ninguno de los dos sea portador?

(d) ¿Cuál es la probabilidad de que uno de ellos sea portador y el otro no? (*Sugerencia*: los valores de p en (b), (c) y (d) serían iguales a 1.)

39. El tipo silvestre (normal) de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, tiene alas rectas y quetas largas. Se han aislado cepas mutantes que tienen, bien alas curvadas, o bien,quetas cortas. Los genes responsables de estos caracteres mutantes se encuentran en autosomas distintos. Examine cuidadosamente los datos de los cinco cruces presentados más abajo.

(a) Determine para cada mutación si es dominante o recesiva. En cada caso, identifique qué cruces apoyan su respuesta.
(b) defina símbolos para los genes y, para cada cruce, determine los genotipos de los padres.

	Número de descendientes			
Cruces	**alas rectas, quetas largas**	**alas rectas, quetas cortas**	**alas curvadas, quetas largas**	**alas curvadas, quetas cortas**
1 rectas, cortas × rectas, cortas	30	90	10	30
2 rectas, largas × rectas, largas	120	0	40	0
3 curvadas, largas × rectas, cortas	40	40	40	40
4 rectas, cortas × rectas, cortas	40	120	0	0
5 curvadas, cortas × rectas, cortas	20	60	20	60

40. Una alternativa a la utilización de la expansión de binomio y del triángulo de Pascal, para determinar la probabilidad de los fenotipos en una generación dada, cuando los genotipos de los padres son conocidos, es utilizar la siguiente ecuación:

$$\frac{n!}{s!t!}a^s b^t$$

en donde n es el número total de descendientes, s el número de descendientes de una clase fenotípica, t el número de descendientes de la otra clase fenotípica, a la probabilidad de que se dé el primer fenotipo y b la probabilidad del segundo fenotipo. Utilizando esta ecuación determine la probabilidad de que una familia con cinco hijos tenga dos hijos afectados con anemia falciforme (una enfermedad autosómica recesiva) cuando ambos padres son heterozigotos para el alelo de la falcemia.

41. Considerando la información del problema 40, ¿a que supone se aplica la siguiente expresión matemática?

$$\frac{n!}{s!t!u!}a^s b^t c^u$$

¿Puede proponer un ejemplo genético en donde podría aplicarse?

42. Para comprobar la ley de la segregación de Mendel utilizando tomates, se cruzaron dos variedades de raza pura, una alta (*EE*) y otra enana (*ee*). Se cruzaron plantas altas heterozigotas (*Ee*) para producir dos grupos de datos F_2, como sigue.

Grupo I	Grupo II
30 altas 5 enanas	300 altas 50 enanas

(a) Utilizando la prueba de χ^2, analice los resultados de ambas series de datos. Calcule los valores de χ^2 y estime los valores de p en ambos casos.
(b) ¿Qué se puede concluir del análisis anterior acerca de la importancia de conseguir grupos de datos grandes en pruebas experimentales?

LECTURAS SELECCIONADAS

Bennett, R.L. et. al. 1995. Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *Am. J. Hum. Genet.* 56:745-52.

Carlson, E.A. 1987. *The gene: A critical history*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders.

Dunn, L.C. 1965. *A short history of genetics*. New York: McGraw-Hill.

Henig, R.M. 2001. *The monk in the garden: The lost and found genius of Gregor Mendel, the father of genetics*. New York: Houghton-Mifflin.

Miller, J.A. 1984. Mendel's peas: A matter of genius or of guile? *Sci. News* 125:108-109.

Olby, R.C. 1985. *Origins of Mendelism*, 2d ed. London: Constable.

Orel, V. 1996. *Gregor Mendel: The first geneticist*. Oxford: Oxford University Press.

Peters, J., ed. 1959. *Classic papers in genetics*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. 1987. *Introduction to biostatistics*, 2nd ed. New York: W.H. Freeman.

Stern, C., and Sherwood, E. 1966. *The origins of genetics: A Mendel source book*. San Francisco: W.H. Freeman.

Stubbe, H. 1972. *History of genetics: From prehistoric times to the rediscovery of Mendel's laws*. Cambridge, MA: MIT Press.

Sturtevant, A.H. 1965. *A history of genetics*. New York: Harper & Row.

Tschermak-Seysenegg, E. 1951. The rediscovery of Mendel's work. *J. Hered.* 42:163-72.

Welling, F. 1991. Historical study: Johann Gregor Mendel 1822–1884. *Am. J. Med. Genet.* 40:1-25.

Ampliaciones de la genética mendeliana



Nuez



Guisante



Roseta



Sencilla

Variaciones heredables de la forma de la cresta en las gallinas, controladas por dos pares de genes.

Conceptos del capítulo

- Aunque los alelos se transmiten de padres a hijos de acuerdo con los principios mendelianos, a menudo no manifiestan las relaciones de dominancia/recesividad claras que observó Mendel.
- En muchos casos, en contraste con la genética mendeliana, se sabe que dos o más genes influyen en el fenotipo de una característica.
- Otra excepción a la herencia mendeliana es la presencia de genes en los cromosomas sexuales, por lo que uno de los sexos tiene un sólo miembro de dichos cromosomas.
- Los fenotipos son a menudo el resultado tanto de los genes como del ambiente en el que se expresan.
- La consecuencia de las distintas excepciones a los principios mendelianos es la existencia de proporciones fenotípicas distintas de las que aparecen en los cruces monohíbridos, dihíbridos y trihíbridos típicos. En conjunto, estas excepciones se denominan «ampliaciones de la genética mendeliana».

En el Capítulo 3 discutimos los principios básicos de la genética de la transmisión. Vimos que los genes se encuentran en cromosomas homólogos y que estos se segregan y se transmiten independientemente de otros cromosomas que se segregan en la formación de los gametos. Estos son los dos principios básicos de la transmisión de genes de padres a hijos. No obstante, cuando un descendiente recibe la dotación completa de genes, es la expresión de estos genes lo que determina el fenotipo del organismo. Cuando la expresión del gen no sigue la forma dominante/recesivo, o cuando más de un par de genes influye en la expresión de un carácter, normalmente quedan modificadas las proporciones clásicas 3:1 y 9:3:3:1 de F_2. En este y en los siguientes capítulos consideraremos modos de herencia más complejos. Aunque se producen formas de herencia más complejas, los principios fundamentales establecidos por Mendel también se cumplen en estas situaciones.

En este capítulo nuestra discusión se limitará inicialmente a la herencia de caracteres regulados por una sola dotación de genes. En organismos diploides, en los que hay pares de cromosomas homólogos, las dos copias de cada gen influyen en tales caracteres. Las copias no tienen que ser necesariamente idénticas, ya que en una población se dan formas alternativas de los genes, o **alelos**. El tema principal será ver cómo actúan los alelos para dar lugar a un fenotipo dado. Luego consideraremos la **interacción génica**, una situación en la que un único fenotipo esta controlado por más de un gen. Para ilustrar una serie de modelos de herencia observados en tales situaciones, se presentarán numerosos ejemplos.

Hasta el momento, hemos restringido muestra discusión a cromosomas distintos de la pareja X e Y. Examinando los casos en los que hay genes en el cromosoma X, demostrando **ligamiento al X**, veremos otras modificaciones de las proporciones mendelianas. Nuestra discusión sobre proporciones modificadas concluye con la consideración de la herencia limitada e influenciada por el sexo, que son casos en donde el sexo del individuo, pero no necesariamente el cromosoma X, influye en el fenotipo. Concluiremos el capítulo mostrando cómo un fenotipo dado varía a menudo dependiendo del ambiente en el que la célula u organismo se encuentra. Esta discusión señala que la expresión fenotípica depende de algo más que sólo el genotipo del organismo.

4.1 Los alelos modifican los fenotipos de maneras diveras

A principios de siglo XX, después del redescubrimiento del trabajo de Mendel, la investigación fijó su atención en las muchas formas en que los genes pueden influir en el fenotipo de un individuo. El curso que tomo la investigación, enraizada en los descubrimientos de Mendel, se denomina genética neo-mendeliana.

Cada tipo de herencia que se describe en este capítulo se investigó cuando los datos observados no se adecuaban de manera precisa con las proporciones mendelianas esperadas. Se propusieron hipótesis que modificaban y ampliaban los principios mendelianos y se comprobaron con cruces diseñados especialmente. Las explicaciones de estas observaciones estaban de acuerdo con el principio de que un fenotipo está controlado por uno o más genes, localizados en loci concretos, situados en uno o más pares de cromosomas homólogos.

Para entender los distintos modos de herencia, tenemos que examinar en primer lugar la potencialidad de un alelo. En algunos organismos en los que se han estudiado poblaciones numerosas, el alelo más frecuente en la naturaleza, al que arbitrariamente se designa como normal, se denomina a menudo como el **alelo de tipo silvestre**. Este frecuente alelo es normalmente dominante, aunque no siempre. Los alelos silvestres son responsables del correspondiente fenotipo silvestre y se utilizan como patrón para comparar con otras mutaciones que se producen en un locus concreto.

Un alelo mutante tiene información genética modificada y a menudo especifica un producto génico alterado. Por ejemplo, en poblaciones humanas, se conocen muchos alelos del gen que codifica para la cadena β de la hemoglobina. Todos estos alelos almacenan información necesaria para la síntesis del cadena polipeptídica β, pero cada uno de ellos especifica una forma ligeramente diferente de la misma molécula. Una vez sintetizado, el producto de un alelo puede tener o no alterada su función.

La mutación es el origen de los alelos. Para que un nuevo alelo se reconozca al observar un organismo, debe dar lugar a un cambio en el fenotipo. Un fenotipo nuevo aparece como consecuencia de un cambio en la actividad funcional del producto celular especificado por dicho gen. Normalmente, la mutación da lugar a la disminución o pérdida de la función específica del tipo silvestre. Por ejemplo, si un gen es responsable de la síntesis de una enzima concreta, la mutación en dicho gen puede cambiar finalmente la conformación de dicha enzima, reduciendo o eliminando su afinidad por el sustrato. Dicha mutación da lugar a una perdida total de la función. Tal caso se designa como una **mutación de pérdida de función**. Si la enzima no se produce, la mutación da lugar a lo que se llama un **alelo nulo**.

Recíprocamente, otras mutaciones pueden incrementar la función del producto de tipo silvestre. Casi siempre que ocurre esto, es como resultado del aumento en cantidad del producto génico. En tales casos, la mutación afecta a la regulación de la transcripción del gen considerado. Tales casos se denominan **mutaciones de ganancia de función**, que normalmente dan lugar a alelos dominantes, ya que en un organismo diploide una copia es suficiente para alterar el fenotipo normal. Como ejemplo de mutaciones de ganancia de función se incluyen la conversión génica de los protooncogenes, que regulan el ciclo celular, a oncogenes, que anulan la regulación por exceso de producto génico. El resultado es el origen de una célula cancerosa.

Habiendo examinado las mutaciones de pérdida o ganancia de función, es importante advertir que existe la posibilidad de que una mutación dé lugar a un alelo del que no pueda detec-

tarse cambio de función. En este caso, la mutación no sería detectable de manera inmediata al no ser evidente variación en el fenotipo. Sin embargo, tal mutación se podría detectar si se examinara la secuencia del DNA del gen. Es también importante advertir que mientras un carácter fenotípico puede quedar afectado por una mutación, a menudo los caracteres están influenciados por muchos productos génicos. En el caso de las reacciones enzimáticas, muchas forman parte de vías metabólicas complejas. Por ello, los fenotipos pueden encontrarse bajo el control de más de un gen y de las formas alélicas de cada uno de los genes implicados. En cada uno de los muchos cruces discutidos en los siguientes capítulos, están implicados sólo uno o muy pocos genes. Recuerde que, en cada cruce, se supone que todos los genes que no se consideran no tienen efectos sobre los patrones de herencia descritos.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo fueron capaces los primeros genéticos de determinar si los alelos mutantes eran dominantes o recesivos respecto de su alelo silvestre?

4.2 Los genéticos utilizan una gran variedad de símbolos para los alelos

En el Capítulo 3 aprendimos a simbolizar a los alelos para caracteres mendelianos simples. Utilizamos la letra inicial del nombre del carácter recesivo, en minúscula y en cursiva, para indicar al alelo recesivo, y la misma letra en mayúscula para referirnos al alelo dominante. Así para *alto* y *enano*, siendo *enano* recesivo, *E* y *e* representan a los alelos responsables de estos caracteres, respectivamente. Mendel también utilizó letras mayúscula y minúscula para simbolizar a sus factores.

En los estudios genéticos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha desarrollado otro sistema útil para discriminar entre los caracteres silvestre y mutante. En este sistema, se selecciona la letra inicial, o una combinación de dos o tres letras, del nombre del carácter mutante. El carácter silvestre se indica con la misma letra, pero con un signo + como superíndice.

Por ejemplo, *ebony* (ebano) es una mutación recesiva que afecta al color del cuerpo de *Drosophila*. El color normal del tipo silvestre es gris. Utilizando el sistema anterior, *ebony* se indica con el símbolo *e* mientras que gris se indica con e^+. En el locus correspondiente puede haber o bien el alelo silvestre (e^+) o el alelo mutante (*e*). Por ello, una mosca diploide puede presentar tres genotipos posibles:

e^+/e^+	homozigotico gris (tipo silvestre)
e^+/e	heterozigoto gris (tipo silvestre)
e/e	homozigótico *ebony* (mutante)

La barra inclinada entre las letras se utiliza para indicar que los dos símbolos de alelo se refieren al mismo locus en dos cromosomas homólogos.

Si hubiéramos considerado un alelo dominante sobre el alelo normal de tipo silvestre, como alas *Wrinkled* (arrugadas) en *Drosophila*, (*Wr*), se utilizaría la letra inicial en mayúscula para designar la dominancia (*Wr*). Así, los tres posibles genotipos serían:

Wr/Wr	alas arrugadas
Wr/Wr^+	alas arrugadas
Wr^+/Wr^+	alas planas, normales

Debido a la dominancia, los dos primeros genotipos expresan el fenotipo mutante alas arrugadas.

Una ventaja del sistema anterior es que, si es necesario, se puede abreviar aun más: El alelo de tipo silvestre se puede indicar simplemente por el símbolo +. Tomando *ebony* como ejemplo, la designación de los tres genotipos posibles se pueden convertir en:

$+/+$	homozigoto gris (tipo silvestre)
$+/e$	heterozigoto gris (tipo silvestre)
e/e	homozigoto *ebony* (tipo mutante)

Este sistema también funciona satisfactoriamente para otros organismos, siempre que haya un inequívoco fenotipo silvestre para el carácter en cuestión. Como veremos en el Capítulo 6, es muy útil cuando se consideran simultáneamente dos o más genes ligados en el mismo cromosoma. Si no hay dominancia podemos utilizar simplemente letras mayúsculas, con superíndices, para indicar a los alelos alternativos (p.e., R^1 y R^2, L^M y L^N, I^A e I^B). Su uso quedará claro en las siguientes secciones de este capítulo.

Otros dos puntos son importantes. Primero, aunque hemos adoptado una convención estándar para asignar símbolos genéticos, hay muchos sistemas de nomenclatura genética que se utilizan para identificar genes en diversos organismos. Normalmente, el símbolo seleccionado refleja la función del gen u, ocasionalmente, la anomalía ocasionada por un gen mutante. Por ejemplo, el gen *CDK* de la levadura se refiere a la codificación de la quinasa dependiente de la ciclina[1]. En bacterias, leu^- se refiere a una mutación que interrumpe la biosíntesis del aminoácido leucina, mientras que el gen de tipo silvestre se designa leu^+. El símbolo *dnaA* se refiere a un gen bacteriano implicado en la replicación del DNA (y DnaA, sin cursiva, se refiere a la proteína especificada por dicho gen). En la especie humana, para nombrar genes se utilizan las letras mayúsculas en cursiva: *BRCA1* se refiere a uno de los genes asociado con la susceptibilidad al

[1] *Nota del traductor:* en inglés, Ciclin-Dependent Kinasa (CDK).

cáncer de mama[2]. Aunque a veces estos sistemas diferentes pueden confundir, todos ellos son diversas formas para simbolizar a los genes.

4.3 Con dominancia incompleta, ningún alelo es dominante

Contrariamente a los cruces mendelianos indicados en el Capítulo 3, un cruce entre padres con caracteres alternativos a veces puede dar lugar a hijos con un fenotipo intermedio. Por ejemplo, si cruzamos plantas de dondiego de noche o de boca de dragón de flores rojas con plantas de flores blancas, los descendientes tienen flores rosas. Ya que se produce algo de pigmento rojo en F_1, las flores presentan un color intermedio rosa, por lo que ni el color rojo de las flores ni el color blanco son dominantes. Tal situación se conoce como **dominancia incompleta.**

Si el fenotipo se encuentra bajo el control de un único gen y ninguno de los dos alelos es dominante, se pueden predecir el resultado del cruce de F_1 rosa × rosa. La generación F_2 resultante que se muestra en la Figura 4.1, confirma la hipótesis de que hay un único par de alelos que determinan estos fenotipos. La proporción genotípica (1:2:1) de F_2 es idéntica a la del cruce monohíbrido de Mendel. Sin embargo, ya que ninguno de los dos alelos es dominante, la proporción fenotípica es idéntica a la proporción genotípica. Advierta que ya que ninguno de los dos alelos es recesivo, no hemos escogido ni letras mayúsculas ni minúsculas como símbolos. En su lugar hemos elegido R^1 y R^2 para nombrar a los alelos rojo y blanco. Podríamos haber escogido B^1 y B^2, o incluso C^B y C^R, en donde C indicaría color y los superíndices B y R indicarían blanco y rojo respectivamente.

Ya que un fenotipo intermedio caracteriza al heterozigoto ¿cómo interpretar la ausencia de dominancia? El modo más correcto es considerar la expresión génica como algo cuantitativo. En el caso anterior del color de la flor, es muy probable que la mutación que da lugar a flores blancas sea una de «pérdida de función» completa. En este caso es probable que el producto génico del alelo silvestre (R^1) sea una enzima que participa en la reacción que da lugar a la síntesis del pigmento rojo. El alelo mutante (R^2) produciría una enzima que no podría catalizar la reacción que da lugar al pigmento. El resultado final es que el heterozigoto produce sólo alrededor de la mitad del pigmento de las plantas con flores rojas, por lo que el fenotipo es rosa.

Los casos bien definidos de dominancia incompleta, son relativamente raros. Sin embargo, aun cuando la dominancia completa sea aparente, un examen cuidadoso de los niveles del producto génico, en lugar del fenotipo, revela a menudo un nivel



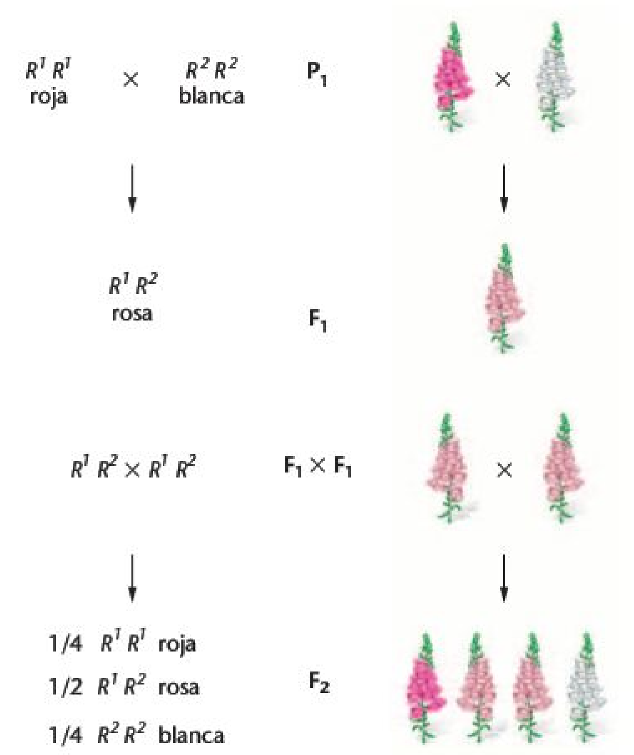


FIGURA 4.1 Dominancia incompleta ilustrada por el color de las flores de boca de dragón.

intermedio de la expresión génica. Un ejemplo es el trastorno bioquímico humano en la **enfermedad de Tay-Sachs**, en la que los individuos homozigotos recesivos están gravemente afectados con una fatal anomalía en el almacenamiento de los lípidos, de tal manera que los recién nacidos mueren del primero al tercer año de vida. En los individuos afectados, casi no hay actividad de la enzima responsable, la **hexosaminidasa A,** que normalmente está implicada en el metabolismo de los lípidos. Los heterozigotos, que sólo tienen una copia del gen mutante, son fenotípicamente normales, pero con sólo un 50 por ciento de la actividad de la enzima que se encuentra en los individuos normales homozigotos. Afortunadamente, este nivel de actividad enzimático es suficiente para alcanzar una función bioquímica normal. Esta situación no es rara en anomalías enzimáticas e ilustra el concepto de **efecto umbral**, por el que la expresión fenotípica normal se da siempre que se alcance un cierto nivel del producto génico. Muy a menudo, y en particu-

[2] *Nota del traductor:* en inglés, BReast CAncer, cáncer de mama.

lar en la enfermedad de Tay-Sachs, el umbral es menor del 50 por ciento.

4.4 En la codominancia es muy evidente la influencia de ambos alelos en el heterozigoto

Si dos alelos de un único gen son responsables en la producción de dos productos génicos diferentes y detectables, surge una situación diferente de la dominancia incompleta o de la dominancia/recesividad. En tal caso, la expresión conjunta de ambos alelos en el heterozigoto se denomina **codominancia**. El **grupo sanguíneo MN** de la especie humana ilustra este fenómeno. Karl Landsteiner y Philip Levine, descubrieron una molécula glicoproteica que se encuentra en la superficie de los glóbulos rojos y que actúa como antígeno innato que proporciona identidad bioquímica e inmunológica a los individuos. En poblaciones humanas hay dos formas de esta glicoproteína, denominadas M y N. Un individuo puede presentar una de ellas o las dos.

El sistema MN se encuentra bajo el control de un locus autosómico, situado en el cromosoma 4, y sus dos alelos se denominan L^M y L^N. Debido a que la especie humana es diploide, son posibles tres combinaciones, dando lugar cada una de ellas a un tipo sanguíneo diferente:

Genotipo	Fenotipo
$L^M L^M$	M
$L^M L^N$	MN
$L^N L^N$	N

El cruce entre dos individuos heterozigotos MN puede dar lugar a hijos con los tres tipos sanguíneos:

$$L^M L^N \times L^M L^N$$
$$\downarrow$$
$$1/4\ L^M L^M$$
$$1/2\ L^M L^N$$
$$1/4\ L^N L^N$$

El ejemplo anterior muestra que en la herencia codominante se puede detectar una clara expresión de los productos génicos de ambos alelos. Esta característica la distingue de otros modos de herencia, como la dominancia incompleta, en donde el heterozigoto expresa un fenotipo intermedio o mezclado. Para que se pueda estudiar la codominancia, ambos productos deben ser fenotípicamente detectables. Veremos otro ejemplo de codominancia cuando examinemos el grupo sanguíneo AB0, que se considerará en la sección siguiente como ejemplo de alelos múltiples, otra situación que nunca encontró Mendel.

4.5 En una población puede haber genes con alelos múltiples

Ya que en cualquier gen hay mucha información almacenada, las mutaciones pueden modificar al gen de muchas maneras. Cada cambio tiene el potencial de dar lugar a un alelo distinto. Por consiguiente, para cualquier gen, el número de alelos presentes en los individuos de una población no tiene por qué estar limitado a dos. Cuando de un mismo gen se encuentran tres o más alelos, se dice que hay **alelos múltiples**, que dan lugar a un modo de herencia característico. Es importante darse cuenta que los *alelos múltiples sólo se pueden estudiar en poblaciones*. Cualquier individuo de un organismo diploide tiene, como mucho, dos loci génicos homólogos, que pueden estar ocupados por alelos diferentes del mismo gen. Sin embargo, en los miembros de una especie, puede haber muchas formas alternativas del mismo gen.

Seminario Web 4.1
Extensiones de la genética mendeliana

El grupo sanguíneo ABO

El caso más simple de alelos múltiples es aquel en el que hay tres alelos alternativos de un gen. Esta situación se presenta en la herencia del **grupo sanguíneo ABO** de la especie humana, descubierto a principios del siglo XX por Karl Landsteiner. El sistema ABO, como el grupo sanguíneo MN, se caracteriza por la presencia de antígenos en la superficie de los glóbulos rojos. Sin embargo, los antígenos A y B son distintos de los antígenos MN y se encuentran bajo el control de un gen diferente, localizado en el cromosoma 9. Como en el sistema MN, una combinación de alelos del sistema ABO presenta un modo de herencia codominante.

El fenotipo ABO de cualquier individuo se averigua mezclando una muestra de sangre con antisuero que tenga los anticuerpos A o B. Si hay antígeno en la superficie de los glóbulos rojos de dicha persona, reaccionará con el correspondiente anticuerpo y se producirá la coagulación o aglutinación de los glóbulos rojos. Cuando se comprueba a un individuo de este modo, puede aparecer uno de los cuatro fenotipos. Cada individuo tiene bien el antígeno A (fenotipo A), bien el antígeno B (fenotipo B), bien los antígenos A y B (fenotipo AB) o bien ninguno de ellos (fenotipo O).

En 1924 se propuso que la herencia de estos fenotipos dependía de tres alelos de un mismo gen. Esta hipótesis se basó en estudios de los grupos sanguíneos de muchas familias distintas. Aunque se pueden utilizar notaciones diversas, utilizaremos los símbolos I^A, I^B e I^O para los tres alelos. La letra I se refiere a **isoaglutinógeno**, otro término para antígeno. Si asumimos que los alelos I^A y I^B son responsables de la producción de los antígenos A y B, respectivamente, y que el I^O es un alelo que no produce ningún antígeno A o B detectable, se puede hacer una lista de los distintos genotipos posibles y de sus correspondientes fenotipos:

Genotipo	Antígeno	Fenotipo
I^AI^A	A	A
I^AI^O	A	A
I^BI^B	B	B
I^BI^O	B	B
I^AI^B	A, B	AB
I^OI^O	Ninguno	O

Advierta en esta tabla que los alelos I^A y I^B son dominantes sobre el alelo I^O, pero codominantes entre si.

Como se muestra en la Tabla 4.1, se puede comprobar la hipótesis de que tres alelos controlan el grupo sanguíneo ABO examinando los descendientes potenciales de muchas combinaciones de cruces. Si asumimos heterozigosis allí donde sea posible, podemos predecir qué fenotipos aparecerán. Estas predicciones teóricas han sido útiles en numerosos estudios en los que se examinaban los grupos sanguíneos de niños y de sus padres en todas las combinaciones fenotípicas posibles. En la actualidad se acepta totalmente la hipótesis de que los grupos sanguíneos ABO en las poblaciones humanas están controlados por tres alelos.

El conocimiento de los grupos sanguíneos humanos tiene varias aplicaciones prácticas. Una de las más importantes es comprobar la compatibilidad en las transfusiones sanguíneas. Otra aplicación se refiere a los casos de disputas de paternidad, cuando los recién nacidos se mezclan inadvertidamente en los hospitales o cuando no se sabe con certeza si un individuo es o no el padre de la criatura. Un examen del grupo sanguíneo ABO, así como de otros antígenos heredados, de los posibles padres y del hijo, puede ayudar a resolver esta situación. Por ejemplo, de todos los cruces que se presentan en la Tabla 4.1, el único que puede dar lugar a descendientes con los cuatro fenotipos es el de dos individuos heterozigotos, uno de fenotipo A y el otro de fenotipo B. Por ello, sólo desde el punto de vista genético, un varón o una mujer pueden excluirse inequívocamente como padres de cierto niño. No obstante, este tipo de pruebas genéticas nunca confirman la paternidad.

Los antígenos A y B

Las bases bioquímicas del grupo sanguíneo ABO se han estudiado cuidadosamente. Realmente, los antígenos A y B son grupos carbohidrato (azúcares) unidos a lípidos (ácidos grasos) que sobresalen de la membrana de los glóbulos rojos. La especificidad de los antígenos A y B se basa en el azúcar terminal del grupo carbohidrato.

Casi todos los individuos poseen lo que se llama la **sustancia H**, a la que se añade uno o dos azúcares terminales. Como se muestra en la Figura 4.2, la sustancia H está compuesta por tres moléculas de azúcar, la galactosa, la *N*-acetilglucosamina (AcGluNH) y la fucosa, unidas químicamente. El alaleo I^A es responsable de una enzima que puede añadir la *N*-acetilgalactosamina (AcGalNH) a la sustancia H. El alelo I^B es responsable de una enzima modificada que no puede añadir la *N*-acetilgalactosamina, pero si la galactosa. Los heterozigotos (I^AI^B) añaden bien un azúcar, bien el otro, en los muchos lugares (substratos) disponibles en la superficie de los glóbulos rojos, explicando la base bioquímica de la codominancia en los individuos de tipo sanguíneo AB. Finalmente, las personas de tipo O (I^OI^O) no pueden añadir ningún azúcar, por lo que sólo tienen la sustancia H sobresaliendo de la superficie de sus glóbulos rojos.

Recientemente se ha aclarado la base molecular de las mutaciones que dan lugar a los alelos I^A, I^B e I^O. Volveremos a este tema en el Capítulo 15, cuando discutamos la mutación y la mutagénesis.

TABLA 4.1 FENOTIPOS ESPERADOS ENTRE LOS DESCENDIENTES DE PADRES CON TODAS LAS POSIBLES COMBINACIONES DEL GRUPO SANGUÍNEO ABO, SUPONIENDO HETEROZIGOSIS SIEMPRE QUE SEA POSIBLE

Padres		Descendencia posible			
Fenotipos	Genotipos	A	B	AB	O
A × A	$I^AI^O \times I^AI^O$	3/4	—	—	1/4
B × B	$I^BI^O \times I^BI^O$	—	3/4	—	1/4
O × O	$I^OI^O \times I^OI^O$	—	—	—	todo
A × B	$I^AI^O \times I^BI^O$	1/4	1/4	1/4	1/4
A × AB	$I^AI^O \times I^AI^B$	1/2	1/4	1/4	—
A × O	$I^AI^O \times I^OI^O$	1/2	—	—	1/2
B × AB	$I^BI^O \times I^AI^B$	1/4	1/2	1/4	—
B × O	$I^BI^O \times I^OI^O$	—	1/2	—	1/2
AB × O	$I^AI^B \times I^OI^O$	1/2	1/2	—	—
AB × AB	$I^AI^B \times I^AI^B$	1/4	1/2	1/2	—

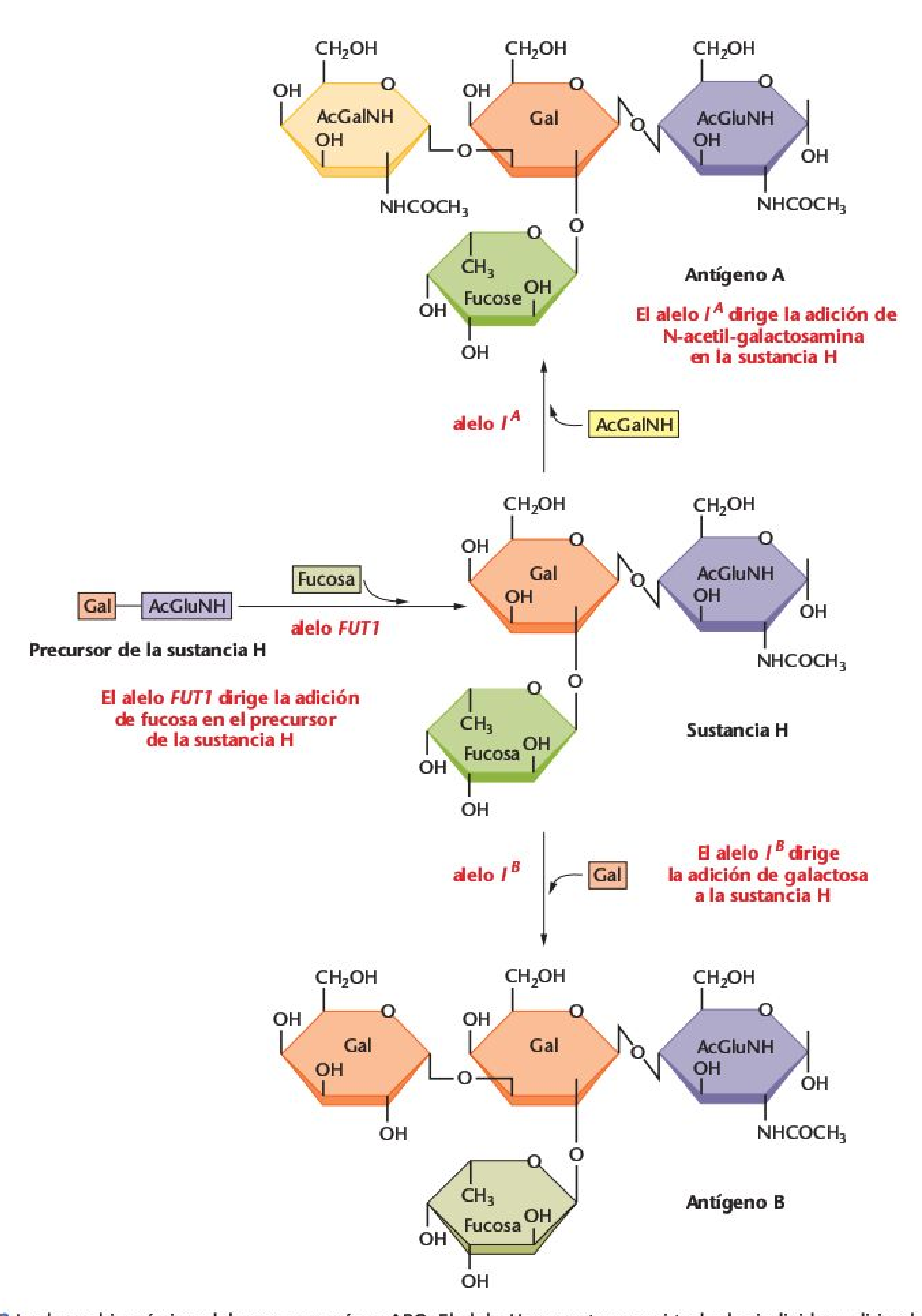


FIGURA 4.2 Las bases bioquímicas del grupo sanguíneo ABO. El alelo *H*, presente en casi todos los individuos, dirige la conversión de una molécula precursora en la sustancia H añadiéndole una molécula de fucosa. Los alelos I^A e I^B pueden entonces dirigir la adición de residuos de azúcar terminales a la sustancia H. El alelo I^O es incapaz de realizar estas adiciones terminales. Gal: galactosa; AcGluNH: N-acetil-glucosamina; AcGalNH: N-acetil-galactosamina. El fallo para producir la sustancia H da lugar al fenotipo Bombay, en donde los individuos son del tipo O, independientemente de la presencia de los alelos I^A e I^B.

El fenotipo Bombay

En 1952 se observó una situación muy poco frecuente, que proporcionó información acerca de las bases genéticas de la sustancia H. Una mujer de Bombay, presentó una historia genética única que no estaba de acuerdo con su grupo sanguíneo. Al necesitar una transfusión de sangre, se encontró que carecía de los antígenos A y B y por ello se tipificó como O. Sin embargo, como se muestra en la genealogía parcial de la Figura 4.3, uno de sus padres era del tipo AB y ella era la donante obvia del alelo I^B a dos de sus hijos. Por ello, era genéticamente B, pero funcionalmente O!

Posteriormente se demostró que esta mujer era homozigota para una mutación recesiva rara en un gen denomina *FUTI* (que codifica a una enzima fucosil transferasa), que impidió que ella sintetizara la sustancia H completa. En esta mutación, en la parte terminal de la cadena de carbohidrato, que sobresale de la membrana de los glóbulos rojos, no había fucosa, la que normalmente se añade por la enzima. En ausencia de la fucosa, las enzimas especificadas por los alelos I^A e I^B son, aparentemente, incapaces de reconocer a la sustancia incompleta H como sustrato apropiado. Así, no se pueden añadir ni la galactosa ni la *N*-acetilgalactosamina terminal, aun cuando las enzimas capaces de hacerlo estén presentes y sean funcionales. Por ello, los genotipos del sistema ABO no pueden expresarse en individuos homozigotos para la forma mutante del gen *FUTI*, y son funcionalmente del tipo O. Para distinguirlos del resto de la población, se dice que presentan el fenotipo Bombay. La frecuencia del mutante *FUTI* es bajísima. Por ello, en la inmensa mayoría de las poblaciones humanas se puede sintetizar la sustancia H.

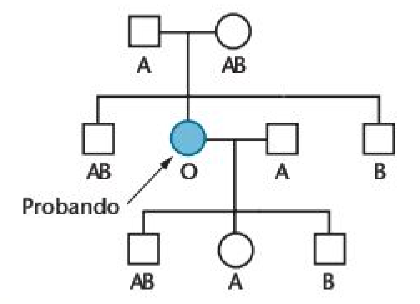


FIGURA 4.3 Genealogía parcial de una mujer que presenta el fenotipo Bombay. Funcionalmente, su grupo sanguíneo ABO se comporta como del tipo O. Genéticamente ella es del tipo B.

El locus *white* de *Drosophila*

Se conocen otros muchos fenotipos en animales y vegetales que están controlados por la herencia de alelos múltiples de un solo locus. Por ejemplo, en *Drosophila*, en donde la inducción de mutaciones ha sido ampliamente utilizada como método de investigación, se conocen muchos alelos para casi cualquier locus. La mutación recesiva de los ojos, *white* (blancos), descubierta por Thomas H. Morgan y Calvin Bridges en 1912, es sólo uno de los más de 100 alelos que pueden ocupar este locus. En esta serie alélica, los colores del ojo van desde la ausencia completa de pigmento, en el alelo *white*, al color rubí intenso, en el alelo *white-satsuma*, pasando por el naranja en el alelo *white-apricot*, y el color ante, en el alelo *white-buff*. Estos alelos se designan w, w^{sat}, w^a y w^{bf}, respectivamente (Tabla 4.2). En cada uno de estos casos, la cantidad total de pigmento de estos mutantes del ojo se reduce a menos del 20 por ciento respecto del que se encuentra en el ojo de tipo silvestre de color rojo ladrillo.



El Problema 4.10 de la página 104 se refiere a una serie de alelos múltiples que controlan el color del pelaje en los conejos.

Sugerencia: Advierta especialmente la jerarquía de dominancia de los distintos alelos. Recuerde también que aun cuando en una población puede haber más de dos alelos, un individuo puede tener como mucho dos de estos. Así, la distribución de los alelos en los gametos cumple el principio de la segregación.

TABLA 4.2 ALGUNO DE LOS ALELOS PRESENTES EN EL LOCUS *WHITE* DE *DROSOPHILA*

Alelo	Nombre	Color del ojo
w	*white*	blanco puro
w^a	*white-apricot*	naranja amarillento
w^{bf}	*white-buff*	ante claro
w^{bl}	*white-blood*	rubí amarillento
w^{cf}	*white-coffee*	rubí intenso
w^e	*white-eosin*	rosa amarillento
w^{mo}	*white-mottled orange*	naranja moteado claro
w^{sat}	*white-satsuma*	rubí intenso
w^{sp}	*white spotted*	grano fino, amarillo jaspeado
w^t	*white-tinged*	rosa claro

4.6 Los alelos letales son genes esenciales

Incontables productos génicos son esenciales para la supervivencia de un organismo. Las mutaciones de pérdida de función que dan lugar a la síntesis de un producto génico no funcional a veces pueden tolerarse en heterozigosis. En tal caso, un alelo de tipo silvestre puede producir una cantidad suficiente del producto esencial como para permitir la supervivencia del organismo. Sin embargo, tal mutación se comporta como **alelo letal recesivo** y los individuos homozigotos recesivos no sobrevivirán. El momento de la muerte dependerá de cuándo sea esencial. En los mamíferos, por ejemplo, esto podría ocurrir en el desarrollo, tempranamente en la niñez, o incluso en el adulto.

En algunos casos, el alelo responsable de un efecto letal en homozigosis, puede dar lugar a un fenotipo mutante característico en heterozigosis. *Tal alelo se comporta como letal recesivo, pero es dominante respecto del fenotipo*. Por ejemplo, a principios del siglo XX se descubrió una mutación que da lugar al pelaje amarillo en los ratones. En la Figura 4.4 se ve la diferencia entre el pelaje amarillo y el pelaje de fenotipo normal agutí. Los cruces entre distintas combinaciones de las dos cepas dieron lugar a resultados poco usuales:

Cruces				
(A) agutí	×	agutí	⟶	todo agutí
(B) amarillo	×	amarillo	⟶	2/3 amarillo: 1/3 agutí
(C) agutí	×	amarillo	⟶	1/2 amarillo: 1/2 agutí

Estos resultados se explican teniendo en cuenta un solo par de alelos. En cuanto al color del pelaje, el alelo mutante amarillo A^Y es dominante sobre el alelo agutí de tipo silvestre A, por

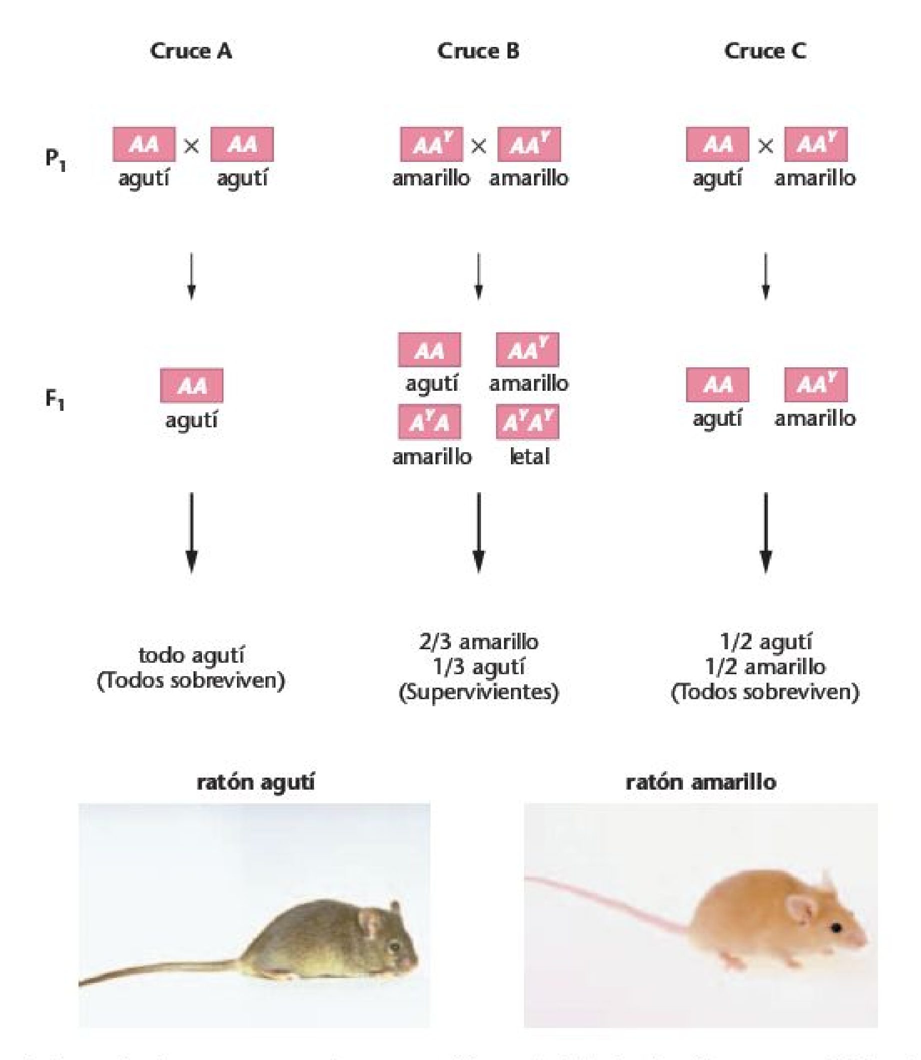


FIGURA 4.4 Patrones de herencia de tres cruces en los que participan el alelo de tipo silvestre agutí (A) y el alelo mutante amarillo (A^Y) en el ratón. Note que el alelo mutante se comporta como dominante frente al alelo normal en cuanto al color del pelaje, pero también se comporta como alelo letal recesivo en homozigosis. El genotipo A^YA^Y no sobrevive.

lo que los ratones heterozigotos tendrán pelaje amarillo. Sin embargo, el alelo amarillo también se comporta como letal recesivo en homozigosis. Los ratones de genotipo A^YA^Y mueren antes de nacer, por lo que nunca se recuperan ratones amarillos homozigotos. Las bases genéticas de estos tres cruces se presentan en la Figura 4.4.

El análisis molecular del gen *A*, tanto en ratones normales agutí como en mutantes amarillos ha proporcionado ideas de cómo una mutación puede ser dominante para un efecto fenotípico (el color del pelaje) y recesivo para otro (el desarrollo embrionario). El alelo A^Y es un ejemplo clásico de una mutación con «ganancia de función». Los animales homozigotos para el alelo silvestre A tienen el pigmento amarillo depositado como una banda en los pelos negros, dando lugar al fenotipo agutí. (Véase la Figura 4.4.) Los heterozigotos depositan el pigmento en toda la longitud del pelo debido a la deleción de la región reguladora que precede en el DNA a la región codificadora del alelo A^Y. Sin posibilidad de regular la expresión del gen, la copia del alelo A^Y está siempre funcionando en los heterozigotos, resultando en la ganancia de función que da lugar al efecto dominante.

El análisis molecular del gen mutante también permite explicar el efecto letal. La amplia deleción de material genético que caracteriza al alelo A^Y se extiende en la región codificadora de un gen adyacente (*Merc*), convirtiéndolo en no funcional. Este gen es imprescindible en el desarrollo embrionario. Es esta «pérdida de función» en los homozigotos A^Y/A^Y lo que da lugar a la letalidad. Los heterozigotos superan el umbral requerido para el producto del gen silvestre *MERC*.

Se sabe que muchos genes presentan propiedades similares en otros organismos. En *Drosophila*, las alas *Curly* (*Cy*)(curvadas), ojos *Plum* (*Pm*)(morados), alas *Dichaete* (*D*), quetas *Stubble* (*Sb*)(cortas) y alas *Lyra* (*Ly*) son letales en homozigosis, pero son dominantes respecto de la expresión del fenotipo mutante en heterozigosis.

Mutaciones letales dominantes

En algunos casos, una copia del gen silvestre no es suficiente para el desarrollo normal, en cuyo caso, incluso el heterozigoto no sobrevivirá. En tal caso, la mutación se comporta como **alelo letal dominante.** Cuando esto ocurre, la presencia de un único alelo que codifica el producto normal puede ser insuficiente para lograr el nivel umbral crítico de un producto génico esencial. O, la presencia del producto génico mutante puede de alguna manera sobrepasar la función normal del producto silvestre.

Uno de los ejemplos más trágicos de un gen letal dominante es el responsable de la **enfermedad de Huntington** en la especie humana (también llamada anteriormente corea de Huntington). Ocasionada por el alelo dominante *H*, la aparición de la enfermedad normalmente se retrasa hasta bien entrada la edad adulta, normalmente hacia los 40 años. Los individuos afectados sufren entonces una degeneración nerviosa y motora gradual y finalmente mueren por la enfermedad unos años después. Esta enfermedad letal es particularmente trágica, porque un individuo afectado puede haber tenido familia antes de descubrir su situación.

Los individuos afectados son heterozigotos (*Hh*) y han recibido el alelo mutante de uno de sus padres. Así pues, cada uno de sus hijos tiene un 50 por ciento de probabilidad de heredar el alelo letal y desarrollar la enfermedad. El cantante y compositor de música popular americana Woody Guthrie, padre de Arlo Guthrie, murió de esta enfermedad a los 39 años.

Los alelos letales dominantes son muy raros. Para encontrarlos en la población, los individuos afectados tienen que reproducirse antes de morir, como puede ocurrir con la enfermedad de Huntington. Si todos los afectados mueren antes de alcanzar la edad reproductiva, el alelo mutante no pasará a las generaciones siguientes y desaparecerá de la población a menos que surjan de nuevo como consecuencia de una mutación nueva.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué planteamiento experimental utilizaron los primeros genéticos para explicar los patrones de herencia que no dan lugar a proporciones mendelianas típicas?

4.7 Las combinación de dos pares de genes implicados en dos modos de herencia modifican la proporción 9:3:3:1

Cada uno de los ejemplos discutido hasta el momento modifica la proporción monohíbrida mendeliana 3:1. Por ello, la combinación de cualquiera de estos tipos de herencia en un cruce dihíbrido modificará igualmente la proporción clásica 9:3:3:1. Una vez establecidos los fundamentos de los modos de herencia de dominancia incompleta, codominancia, alelos múltiples y alelos letales, podemos tratar ahora la situación de que dos modos de herencia se den simultáneamente. El principio mendeliano de la transmisión independiente se aplica a estas situaciones, siempre que los genes que controlan cada carácter no estén ligados en el mismo cromosoma.

Por ejemplo, supongamos que se da un cruce entre un varón y una mujer en donde ambos son heterozigotos para el gen autosómico recesivo para el albinismo y que ambos son del grupo sanguíneo AB. ¿Cuál es la probabilidad de que se dé cualquier combinación fenotípica concreta en cada uno de sus hijos? El albinismo se hereda en la forma mendeliana simple, y los grupos sanguíneos están determinados por una serie de tres alelos múltiples I^A, I^B e I^O. La solución a este problema se esquematiza en la Figura 4.5.

En lugar de que este cruce produzca los cuatro fenotipos clásicos en la proporción 9:3:3:1, aparecen seis fenotipos en la proporción 3:6:3:1:2:1, que indica la probabilidad esperada para

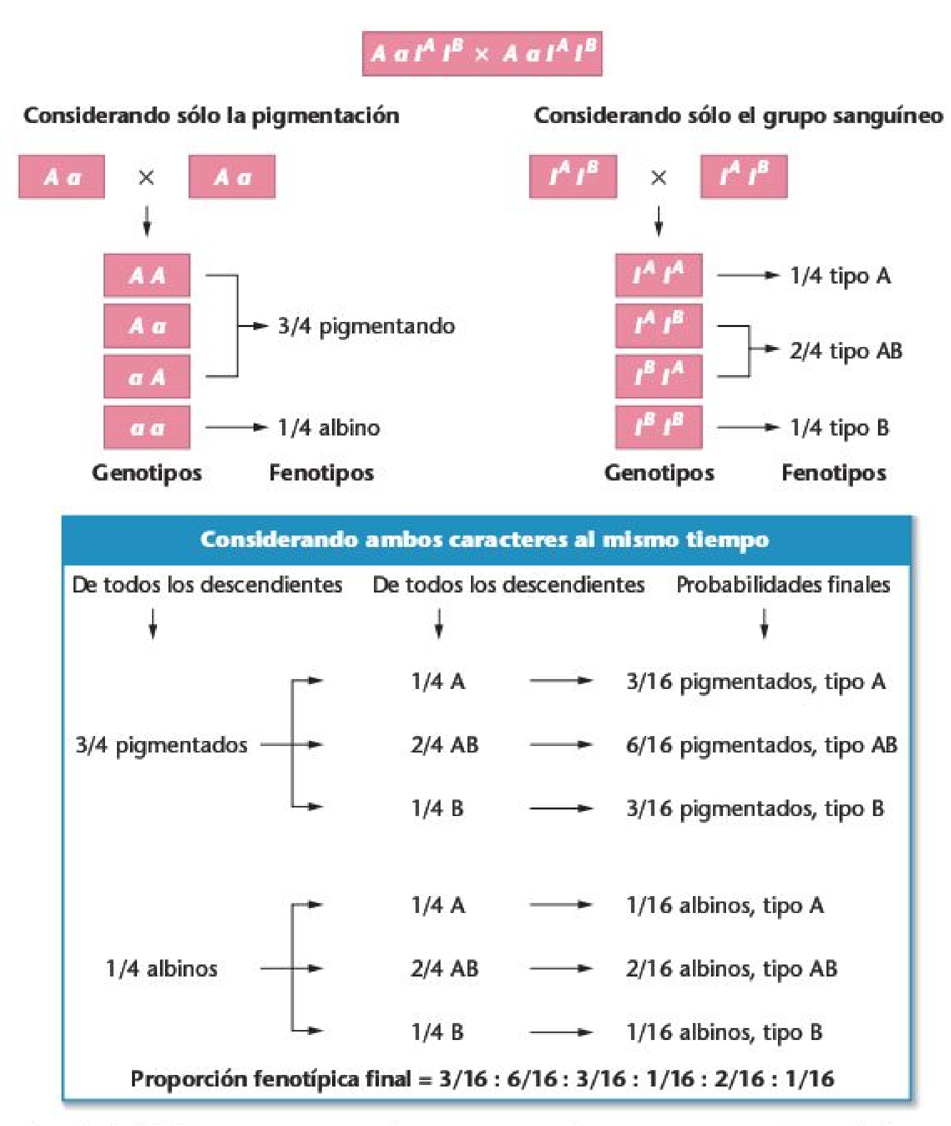


FIGURA 4.5 Cálculo de probabilidades en un cruce en el que participan el grupo sanguíneo ABO y el albinismo en la especie humana. El cálculo se realiza utilizando el método de la bifurcación en línea.

cada fenotipo. La Figura 4.5 resuelve el problema utilizando el método de la bifurcación en línea, descrito en el Capítulo 3. Recordemos que el método de la bifurcación en línea requiere que las proporciones para cada carácter se calculen individualmente (lo que normalmente se hace por inspección). Entonces se pueden calcular todas las posibles combinaciones. También podríamos resolver el problema utilizando el método más convencional del cuadrado de Punnet.

Este ejemplo es una de las muchas variantes de posibles proporciones modificadas cuando se combinan diferentes tipos de herencia. Podemos tratar de modo similar cualquier combinación de dos tipos de herencia. Cuando resuelva los problemas al final del capítulo, se le pedirá que determine los fenotipos y las probabilidades esperadas para muchas de estas combinaciones. En cada caso, la proporción fenotípica final es una modificación de la proporción dihíbrida 9:3:3:1.

4.8 A menudo los fenotipos están afectados por más de un gen

Muy poco después del redescubrimiento del trabajo de Mendel, datos experimentales revelaron que muchos caracteres, que se manifiestan como fenotipos discretos, se encuentran a menudo bajo el control de más de un gen. Éste fue un descubrimiento importante porque reveló que la influencia de los genes sobre el fenotipo es mucho más compleja que la que encontró Mendel en sus cruces con el guisante de jardín. En lugar de que un único gen controle el desarrollo de partes concretas del animal o de la planta, pronto quedó claro que características fenotípicas, como el color de los ojos, el color del pelo o la forma del fruto, estaban influidas por muchos genes y sus productos correspondientes.

El término **interacción génica** se usa a menudo para describir la idea de que varios genes influyen sobre una característica concreta. Sin embargo, esto no significa que dos o más genes, o sus productos, interactúen necesariamente de manera directa para dar lugar a un fenotipo concreto. más bien, la función celular de numerosos productos génicos contribuyen al desarrollo de un fenotipo común. Por ejemplo, el desarrollo de un órgano como el ojo de un insecto es extraordinariamente complejo y da lugar a una estructura con manifestaciones fenotípicas múltiples —descritos de la manera más sencilla como una forma, tamaño, textura y color específicos. El desarrollo del ojo se puede comprender mejor como el resultado de una cascada compleja de acontecimientos en el desarrollo. Este proceso ilustra el concepto **epigenético** del desarrollo, en donde cada paso sucesivo del desarrollo aumenta la complejidad de estos órganos sensoriales, pasos que están bajo el control e influencia de muchos genes. Para clarificar la interacción génica, presentaremos numerosos ejemplos, algunos de los cuales ilustran la interacción génica a nivel bioquímico.

Epistasia

Algunos de los mejores ejemplos de interacción génica son aquellos que presentan el fenómeno de la **epistasia**. Derivada de la palabra griega que significa *interrupción*, se da epistasia cuando la expresión de un gen o de un par de genes enmascara o modifica la expresión de otro gen o par génico. Los genes im-

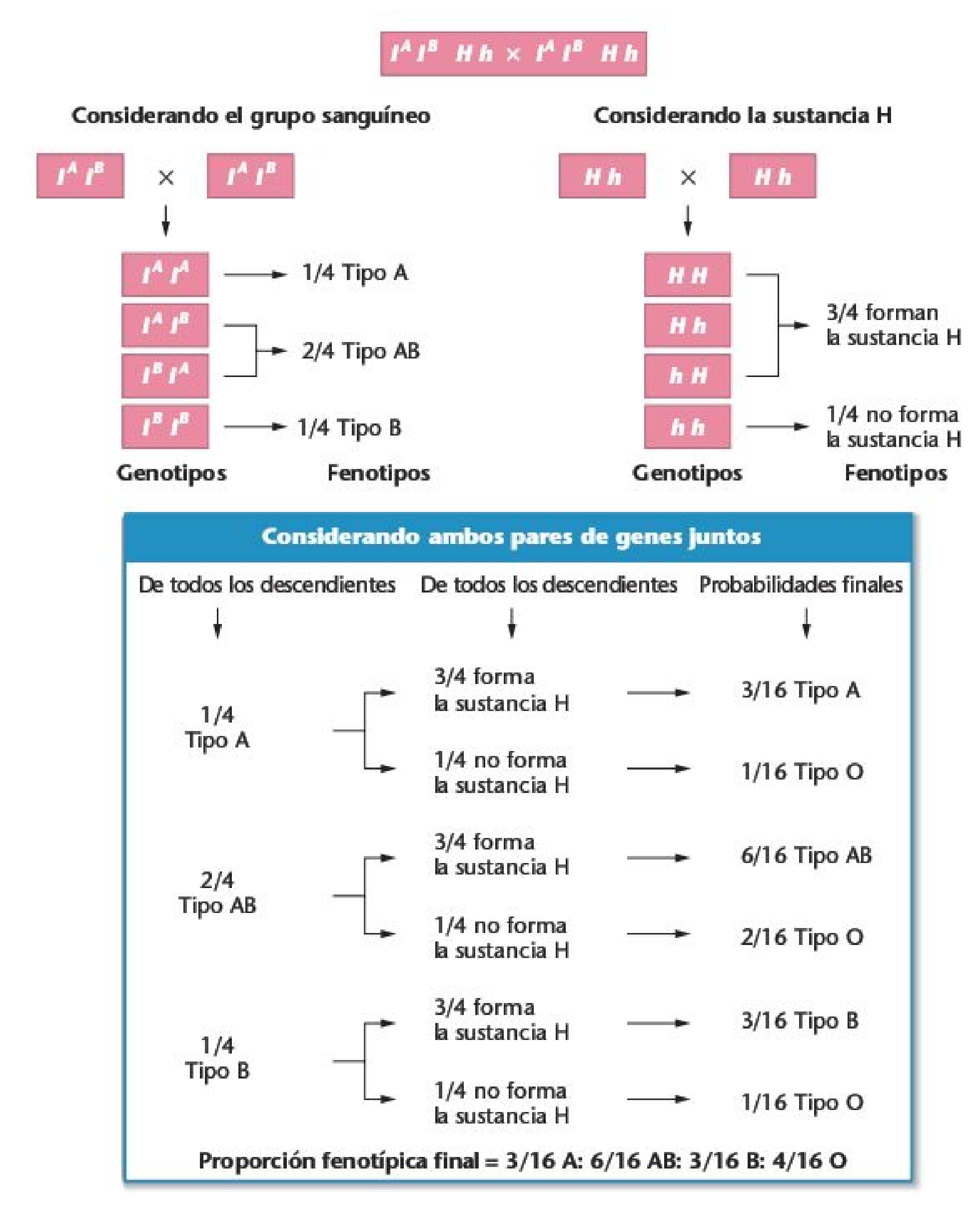


FIGURA 4.6 Resultado del cruce entre individuos heterozigotos para dos genes que determinan el grupo sanguíneo ABO de cada individuo. Los fenotipos finales se calculan considerando ambos genes por separado y combinando luego los resultados mediante el método de la bifurcación en línea.

plicados controlan la expresión de la misma característica fenotípica, algunas veces de una manera antagonista, como cuando ocurre enmascaramiento. Sin embargo, en otros casos, los genes implicados ejercen su influencia de manera complementaria o cooperativa.

Por ejemplo, la presencia en homozigosis de un alelo recesivo puede evitar o anular la expresión de otro alelo en un segundo locus (o en otros loci). En este caso, los alelos del primer locus se dice que son **epistáticos** con respecto a los del segundo locus. Los alelos del segundo locus que son enmascarados, se dice que son **hipostáticos** respecto de los del primer locus. Como veremos, se dan distintas variaciones sobre esta situación. En otro ejemplo de interacción génica, dos pares de genes pueden **complementarse** de tal manera que para expresar un fenotipo concreto es necesario al menos un alelo dominante de cada locus. Si no se encuentran ambos, el resultado es un fenotipo alternativo.

Anteriormente, cuando discutimos el fenotipo Bombay, se examinó un ejemplo de la condición homozigótica recesiva de un locus que enmascara la expresión de un segundo locus. En aquel caso, establecimos que la situación homozigota de la forma mutante del gen *FUTI* enmascara la expresión de los alelos I^A e I^B. Sólo los individuos que tienen al menos un alelo silvestre FUTI pueden formar los antígenos A o B. Por ello, los individuos cuyos genotipos incluyen los alelos I^A o I^B y que carezcan del alelo silvestre son del fenotipo O, independientemente de su potencial para fabricar ambos antígenos. En la Figura 4.6 se presenta un ejemplo del resultado del cruce entre individuos heterozigotos para ambos loci. Si muchos individuos tienen hijos, la proporción fenotípica esperada en los descendientes será 3 A:6 AB:3 B:4 O.

Es importante advertir dos cosas cuando se examina dicho cruce y las proporciones fenotípicas esperadas

1. En este cruce hay una distinción importante cuando se compara con el cruce dihíbrido modificado de la Figura 4.5: *sólo aparece una característica —el tipo sanguíneo.* En el cruce dihíbrido modificado de la Figura 4.5, aparece el tipo sanguíneo *y* la pigmentación de la piel, como características fenotípicas diferentes.
2. Aun cuando aparece un solo carácter, las proporciones fenotípicas se expresan en 16avos. Si no supiéramos nada acerca de la sustancia H y del gen que la controla, estaríamos seguros de que hay un segundo par génico implicado en la expresión fenotípica, distinto del que controla los antígenos A y B. *Cuando al estudiar un carácter, aparece una proporción que se expresa en 16avos (p.e., 3:6:3:4), esto sugiere que hay dos pares de genes «interaccionando» en la expresión del fenotipo en cuestión.*

Patrones de herencia únicos

El estudio de la interacción génica ha revelado cierto número de patrones de herencia que modifican la típica proporción mendeliana de F_2 (9:3:3:1). En varios de los ejemplos siguientes, la epistasia tiene el efecto de combinar una o más clases de las cuatro clases fenotípicas de varias maneras. En la Figura 4.7 se revisa la generación de estos cuatro grupos, junto con varias proporciones modificadas.

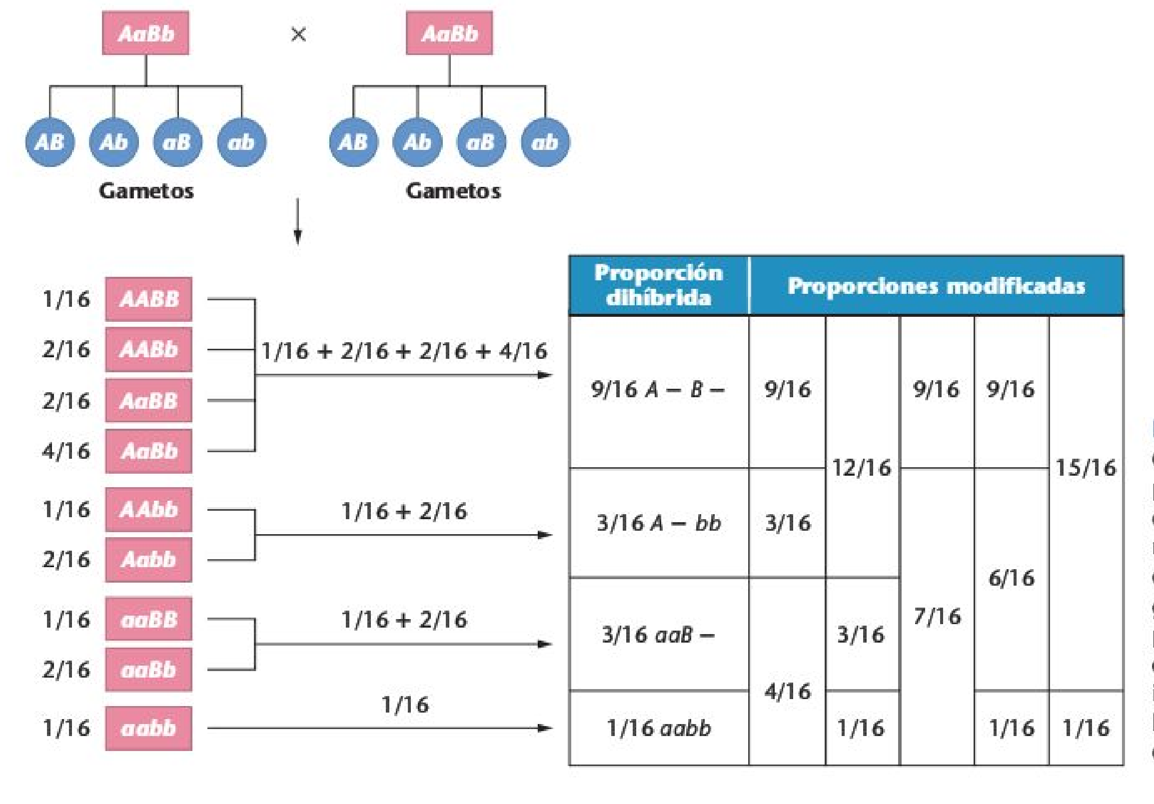


FIGURA 4.7 Obtención de varias proporciones dihíbridas modificadas a partir de los nueve genotipos que se producen en un cruce entre individuos heterozigotos para dos genes.

A medida que discutamos estos y otros ejemplos (véase la Figura 4.8), haremos varias suposiciones y adoptaremos ciertas convenciones, como las siguientes:

1. En cada caso, se producen clases fenotípicas distintas, cada una de ellas perfectamente discernible de las otras. Tales caracteres ilustran variación discontinua, en donde las categorías fenotípicas son discretas y cualitativamente diferentes entre si.
2. Los genes que se consideran en cada cruce no están ligados y por consiguiente se transmiten independientemente unos de otros en la formación de los gametos. Para que se puedan comparar fácilmente los resultados de diferentes cruces, designaremos a los alelos como *A,a* y *B,b* en cada caso.
3. Cuando suponemos que hay dominancia completa entre los alelos de cualquier par génico, de tal manera que *AA* y *Aa*, o *BB* y *Bb* son equivalentes en sus efectos genéticos, utilizaremos para ambas combinaciones la notación *A*– o *B*–, en donde el guión (–) indica que puede estar presente cualquier alelo, sin consecuencias sobre el fenotipo.
4. Todos los cruce P_1 implican individuos homozigotos (p.e. *AABB* × *aabb*, *AAbb* × *aaBB* o *aaBB* × *AAbb*). Por consiguiente, cada F_1 consta sólo de genotipos heterozigotos *AaBb*.
5. En cada ejemplo, la generación F_2 obtenida de estos padres heterozigotos será el objeto del análisis. Cuando estén implicados dos genes (Figura 4.7), los genotipos F_2 pertenecen a cuatro categorías posibles: 9/16 *A-B-*, 3/16 *A-bb*, 3/16 *aaB-* y 1/16 *aabb*. Debido a la dominancia, todos los genotipos de cada categoría son equivalentes en sus efectos sobre el fenotipo.

El primer caso que discutimos es la herencia del color del pelaje de los ratones (caso 1 de la Figura 4.8). Como vimos al discutir los alelos letales, el color normal del pelaje es agutí, un patrón grisáceo formado por bandas de pigmento negro y amarillo alternantes en cada pelo. (Véase la Figura 4.4.) El pelo agutí es dominante sobre negro (no agutí), que está ocasionado por la expresión homozigótica de una mutación recesiva, *a*. Así, *A*- es agutí, mientras que *aa* es de pelaje negro. Una mutación recesiva *b*, de otro locus, cuando está en homozigosis, elimina la pigmentación, dando lugar a ratones albinos (*bb*), independientemente del genotipo del locus *a*. La presencia de al menos un alelo *B* permite que se produzca la pigmentación de manera similar al alelo *FUTI* de la especie humana, que permite la expresión del grupo sanguíneo ABO. En un cruce entre agutí (*AABB*) y albino (*aabb*), los individuos F_1 son todos *AaBb* y tienen el color del pelaje agutí. En la descendencia F_2 de un cruce entre dos dobles heterozigotos F_1, se observan los siguientes genotipos y fenotipos:

$$F_1: AaBb \times AaBb$$
$$\downarrow$$

Proporción F_2	Genotipos	Fenotipos	Proporción Fenotípica Final
9/16	*A– B–*	agutí	9/16 agutí
3/16	*A– bb*	albino	4/16 albino
3/16	*aa B–*	negro	3/16 negro
1/16	*aa bb*	albino	

Caso	Organismo	Carácter	Fenotipos F_2 9/16	3/16	3/16	1/16	Proporción modificada
1	Ratones	Color del pelaje	agutí	albino	negro	albino	9:3:4
2	Calabaza	Color	blanco		amarillo	verde	12:3:1
3	Guisante	Color de la flor	púrpura	blanco			9:7
4	Calabaza	Forma del fruto	discoidal	esférico		alargado	9:6:1
5	Gallinas	Color	blanco		con color	blanco	13:3
6	Ratones	Color	con manchas blancas	blanco	con color	con manchas blancas	10:3:3
7	«Bolsa de pastor»	Cápsula de la semilla	triangular			ovoide	15:1
8	Escarabajo de la harina	Color	6/16 negruzco: 3/16 rojo	negro	azabache	negro	6:3:3:4

FIGURA 4.8 Bases de las proporciones fenotípicas F_2 dihíbridas modificadas, que resultan del cruce entre individuos F_1 doble heterozigotos. Las cuatro agrupaciones de los genotipos F_2 que se muestran en la Figura 4.7 y en la parte superior de esta figura, se encuentran combinadas de diversas formas para producir estas proporciones.

Podemos imaginar la interacción génica que produce la proporción observada 9:3:4 en F_2 como un proceso en dos pasos:



En presencia de un alelo *B*, se puede formar pigmento negro a partir de una sustancia incolora. En presencia de un alelo *A*, el pigmento negro se deposita durante el desarrollo del pelo en un patrón que produce el fenotipo agutí. Si se da el genotipo *aa*, todo el pelo es negro. Si se da el genotipo *bb*, no se produce pigmento negro, e independientemente de la presencia de los alelos *A* o *a*, el ratón será albino. Por consiguiente el genotipo homozigoto *bb* enmascara o suprime la expresión del alelo *A*. En consecuencia, esto se denomina *epistasia recesiva*.

Una variante de lo anterior, llamada *epistasia dominante*, se da cuando un alelo dominante de un locus génico, enmascara la expresión de los alelos de un segundo locus. Por ejemplo, el caso 2 de la Figura 4.8 trata de la herencia del color del fruto de la calabaza común. Aquí el alelo dominante *A* da lugar a un fruto de color blanco, independientemente del genotipo de un segundo locus *B*. En ausencia del alelo dominante *A* (el genotipo *aa*), *BB* o *Bb* dan lugar a color amarillo, mientras que *bb* da lugar a color verde. Por consiguiente, si se cruzan dos dobles heterozigotos blancos (*AaBb*), aparece una interesante proporción genética debido a dicha epistasia:

F_1: *AaBb* × *AaBb*

↓

Proporción F_2	Genotipos	Fenotipos	Proporción Fenotípica Final
9/16	*A– B–*	blanco	12/16 blanco
3/16	*A– bb*	blanco	
3/16	*aa B–*	amarillo	3/16 amarillo
1/16	*aa bb*	verde	1/16 verde

De los descendientes, 9/16 son *A-B-* y serán blancos. Los 3/16 que llevan el genotipo *A-bb* también serán blancos. De las restantes calabazas, 3/16 serán amarillas (*aaB-*), mientras que 1/16 serán verdes (*aabb*). Así se da la proporción fenotípica modificada 12:3:1.

Nuestro tercer ejemplo (caso 3 de la Figura 4.8), descubierto por William Bateson y Reginald Punnett (del famoso tablero de Punnett), se presenta en un cruce entre dos cepas de guisantes de olor con flores blancas. Inesperadamente, todas las plantas F_1 fueron púrpura, y en F_2 apareció la proporción de 9/16 púrpura y 7/16 blanca. La explicación propuesta para este resultado sugiere que la presencia de al menos un alelo dominante de cada uno de los dos pares de genes es esencial para que las flores sean púrpura. Por ello este caso es un ejemplo de *interacción génica complementaria*. Todas las otras combinaciones genotípicas dan lugar a flores blancas ya que la homozigosis de cualquiera de los alelos recesivos enmascara la expresión de los alelos dominantes del otro locus.

El cruce se presenta como sigue:

P_1: *AAbb* × *aaBB*

blanco   blanco

↓

F_1: All *AaBb* (púrpura)

↓

Proporción F_2	Genotipos	Fenotipos	Proporción fenotípica final
9/16	*A– B–*	púrpura	
3/16	*A– bb*	blanco	9/16 púrpura
3/16	*aa B–*	blanco	7/16 blanco
1/16	*aa bb*	blanco	

Podemos imaginar la forma en la que los dos pares de genes podrían dar tales resultados:

	Gen A		Gen B	
Sustancia precursora (sin color)	↓ ⟶ *A–*	Producto intermedio (sin color)	↓ ⟶ *B–*	Producto final (púrpura)

Para asegurar ambas transformaciones bioquímicas hasta el producto final, y producir flores púrpura, es necesario, al menos, un alelo dominante de cada par de genes. En el cruce anterior esto ocurre en el 9/16 de los descendientes F_2. Todas las otras plantas (7/16) tendrán flores blancas.

Estos tres ejemplos ilustran de manera sencilla como interactúan los productos de dos genes para influir en el desarrollo de un fenotipo común. En otros ejemplos, hay implicados en el control de la expresión fenotípica más de dos genes y sus productos.

Fenotipos Nuevos

Otros casos de interacción génica producen fenotipos nuevos en la generación F_2, además de producir proporciones dihíbridas modificadas. El caso 4 de la Figura 4.8 muestra la herencia de la forma del fruto en la calabaza común *Cucurbita pepo*. Cuando se cruzan plantas con fruto en forma de disco (*AABB*) con plantas con fruto alargado (*aabb*), toda la F_1 tiene fruto discoidal. Sin embargo, en la descendencia F_2 aparece un fruto con una nueva forma —esférico— así como frutos que presentan los fenotipos paternos. Estos fenotipos se muestran en la Figura 4.9.

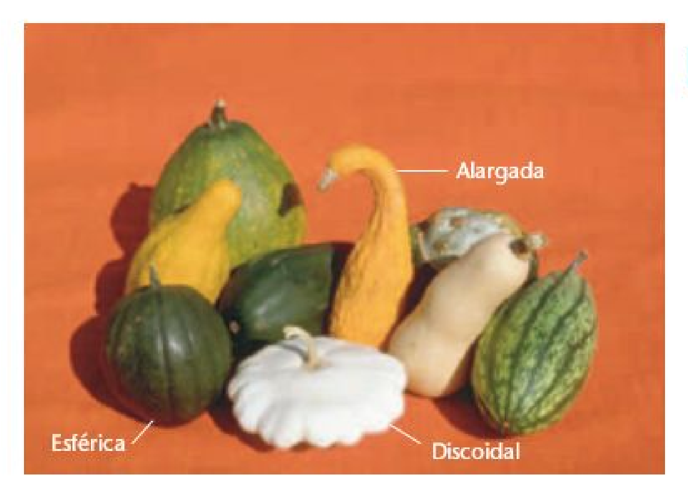


FIGURA 4.9 Calabazas con diversos fenotipos de la forma del fruto, en donde son aparentes la discoidal (blanca), la alargada (naranja cuello de ganso) y la esférica (parte inferior izquierda).



El Problema 4.17 de la página 105 se refiere a una característica sencilla, el color de la flor, que puede variar de tres maneras. Se le pide que determine cuantos genes están implicados en la herencia del color de la flor, y qué genotipos son responsables de cada fenotipo.

Sugerencia: La información más importante es el dato proporcionado. Se deben analizar los datos brutos y convertir los números en proporciones con significado. Esto le guiará para determinar cuántos pares de genes están implicados. Luego se pueden clasificar las proporciones genotípicas de una manera que encajen con las proporciones fenotípicas.

La generación F_2, con una proporción modificada 9:6:1, es como sigue:

F_1: *AaBb* × *AaBb*

discoidal ↓ discoidal

Proporción F_2	Genotipos	Fenotipos	Proporción Fenotípica Final
9/16	*A– B–*	discoidal	9/16 discoidal
3/16	*A– bb*	esférico	3/16 esférico
3/16	*aa B–*	esférico	
1/16	*aa bb*	alargado	1/16 alargado

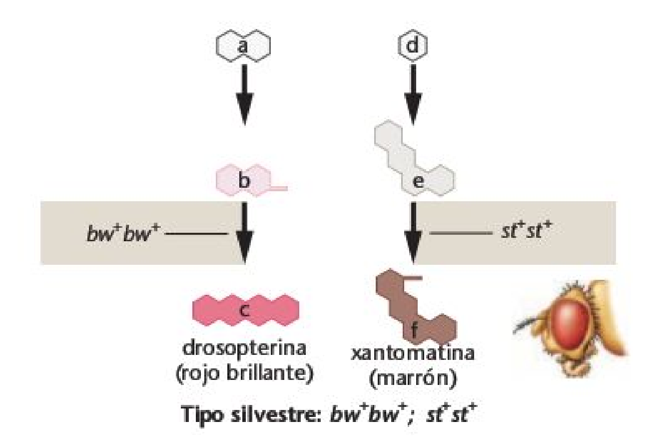
En este ejemplo de interacción génica, ambos pares de genes influyen de manera equivalente en la forma del fruto. Un alelo dominante de cualquier locus asegura una forma de fruto esférica. En ausencia de los alelos dominantes el fruto es alargado. Sin embargo, si están presentes los dos alelos dominantes (*A* y *B*) el fruto es achatado, en forma de disco.

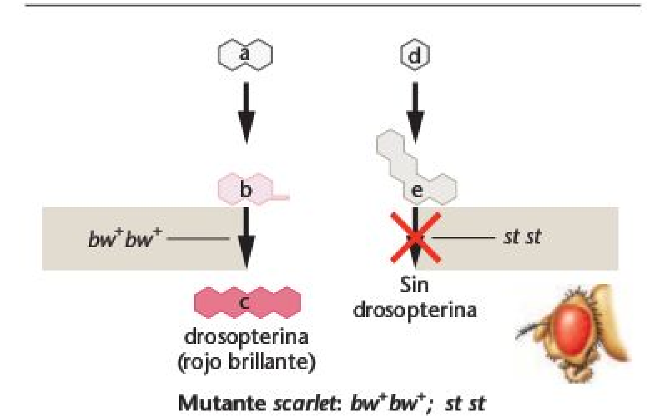
Otro ejemplo interesante, en el que surge un fenotipo inesperado en la generación F_2, es la herencia del color del ojo en *Drosophila melanogaster*. El ojo de tipo silvestre es de color rojo ladrillo. Cuando se cruzan dos mutantes autosómicos recesivos, *brown* (marrón) y *scarlet* (escarlata), la generación F_1 tiene ojos de color silvestre. En la generación F_2 se encuentran moscas con ojos de color silvestre, escarlata, marrón y blanco en la proporción 9:3:3:1. Aunque esta proporción es numéricamente la misma que la proporción dihíbrida mendeliana, el cruce en *Drosophila* implica sólo a un carácter, el color del ojo. Esta es una distinción importante cuando se estudian proporciones dihíbridas modificadas que resultan de interacción génica.

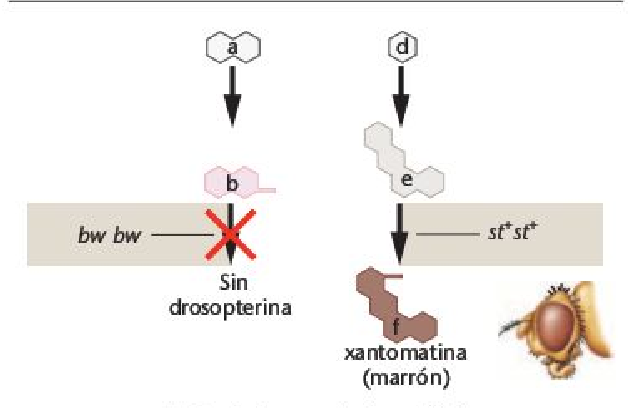
El cruce en *Drosophila* es un ejemplo excelente de interacción génica, ya que en este organismo se han determinado las bases bioquímicas del color del ojo. (Figura 4.10). *Drosophila*, como artrópodo típico, tiene ojos compuestos, formados por unidades visuales individuales llamadas omatidios. El color del ojo de tipo silvestre se debe a la deposición y mezcla de dos grupos de pigmentos distintos en cada omatidio -los pigmentos rojo brillante **drosopterinas** y el pigmento marrón **xantomatina**. Cada pigmento se produce en rutas bioquímicas distintas. Cada paso de cada ruta está catalizado por una enzima distinta que está bajo el control de un gen diferente. Como se muestra en la Figura 4.10, la mutación *brown*, en homozigosis, interrumpe la vía que conduce a la síntesis del pigmento rojo brillante. Debido a que sólo queda xantomatina, el color del ojo es marrón. La mutación recesiva *scarlet* afecta a un gen localizado en un autosoma distinto, que interrumpe la ruta que conduce a la síntesis de la xantomatina marrón y da lugar a un ojo de color rojo brillante en las moscas mutantes homozigotas. Cada mutación da lugar, aparentemente, a una enzima no funcional. Las moscas que son mutantes dobles, y por ello homozigotas para *brown* y *scarlet*, carecen de ambas enzimas funcionales y no pueden producir ninguno de los dos pigmentos; representan al nuevo fenotipo de moscas de ojos blancos, que aparece en el 1/16 de la generación F_2. Advierta que la ausencia de pigmento en estas moscas no se debe a la mutación *white* ligada al X, en donde los pigmentos se pueden sintetizar, pero los precursores necesarios no se pueden transporta a las células que constituyen los omatidios.

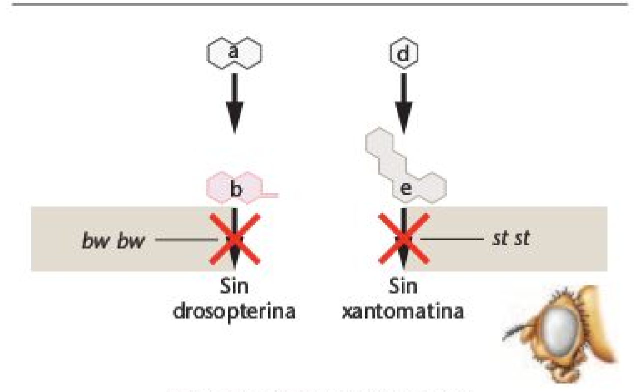
Otras proporciones dihíbridas modificadas

Los restantes casos (5-8) de la Figura 4.8 ilustran más modificaciones de la proporción dihíbrida y proporcionan otros ejemplos de interacciones génicas. Como se puede advertir, se presentan las proporciones 13:3, 10:3:3, 15:1 y 6:3:3:4. Estos casos, como los cuatro anteriores, tienen dos cosas en común. Primero, al llegar a una explicación adecuada del patrón de herencia de cada uno, no violamos el principio de la segregación ni de la transmisión independiente. Por consiguiente, la complejidad añadida a estos tipos de herencia en estos ejemplos no invalida las conclusiones mendelianas. Se-









gundo, en cada caso, la proporción fenotípica en F_2 se expresa en dieciseisavos. Cuando se hacen observaciones similares en cruces en los que se desconoce el patrón de herencia, sugieren que dos pares de genes están controlando los fenotipos observados. Se puede hacer la misma deducción en el análisis de problemas genéticos. En la sección «Ideas y Soluciones», al final de este capítulo, se proporcionan otras ideas para resolver problemas.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo establecieron los genéticos que la herencia de algunas características fenotípicas implica la interacción de dos o más pares de genes? ¿Cómo determinaron cuantos pares de genes estaban implicados?

4.9 La expresión de un solo gen puede tener efectos múltiples

Mientras que en la sección precedente nos hemos fijado en los efectos de dos o más genes sobre una sola característica, la situación inversa, en donde la expresión de un solo gen tiene efectos fenotípicos múltiples, es muy corriente. Este fenómeno, que se manifiesta cuando se hace un examen cuidadoso de los fenotipos, se denomina **pleiotropía**. Hay muchos ejemplos excelentes que se pueden deducir de enfermedades humanas y revisaremos dos de tales ejemplos para ilustrar este punto.

La primera enfermedad es el **síndrome de Marfan**, cuyo origen es una mutación dominante autosómica en el gen que codifica para la proteína fibrilina del tejido conjuntivo. Debido a que esta proteína está ampliamente distribuida en muchos tejidos del organismo, se esperarían efectos múltiples de tal defecto. De hecho, la fibrilina es importante para la integridad estructural del cristalino y de los huesos, y para el revestimiento de los vasos sanguíneos, como la aorta. Por ello, el fenotipo asociado al síndrome de Marfan incluye dislocación de cristalino, aumento del riesgo de aneurismas aórticos y alarga-

FIGURA 4.10 Explicación teórica de la base bioquímica de cuatro fenotipos de color del ojo que aparecen en un cruce entre moscas con ojos *brown* y *scarlet* de *Drosophila*. En presencia de al menos un alelo de tipo silvestre bw^+, se produce una enzima que convierte la sustancia b en c, y se sintetiza el pigmento drosopterina. En presencia de al menos un alelo de tipo silvestre st^+, la sustancia e se convierte en f, y se sintetiza el pigmento xantomatina. La presencia en homozigosis de los alelos mutantes recesivos *bw* y *st* bloquean la síntesis, respectivamente, de estas moléculas pigmentarias. Ambas, ninguna o una de estas rutas pueden quedar bloqueadas dependiendo del genotipo.

mientos de los huesos largos de las extremidades. Esta anomalía tiene interés histórico por las especulaciones de que Abraham Lincoln estuvo afectado.

Un segundo ejemplo se refiere a otra enfermedad autosómica dominante, la **porfiria variegada**. Los individuos afectados no pueden metabolizar adecuadamente la porfirina de la hemoglobina cuando se degrada este pigmento respiratorio como consecuencia de la sustitución de los glóbulos rojos. La acumulación del exceso de porfirina es evidente de manera inmediata en la orina, que adquiere un color rojo intenso. Sin embargo, esta característica fenotípica es simplemente diagnóstica. Los aspectos graves del fenotipo se deben a la naturaleza tóxica de la acumulación de porfirinas en el organismo, especialmente en el cerebro. La caracterización fenotípica completa incluye dolores abdominales, debilidad muscular, fiebre, aceleración del pulso, insomnio, dolor de cabeza, problemas de visión (que pueden dar lugar a ceguera), delirio y, finalmente, convulsiones. Como se puede ver, es imposible decidir cual de los rasgos fenotípicos caracteriza mejor a la enfermedad.

Al igual que el síndrome de Marfan, la porfiria variegada tiene también significado histórico. Jorge III, rey de Inglaterra durante la guerra de la independencia americana, se cree que sufrió episodios con todos los síntomas anteriores. Finalmente quedó ciego y senil antes de su muerte.

Hay otros muchos ejemplos que podrían citarse aquí para ilustrar la pleiotropía. Basta decir que si se analizan cuidadosamente, la mayoría de las mutaciones presentan más de una manifestación cuando se expresan.

4.10 El ligamiento al X se refiere a genes del cromosoma X

En muchas especies animales y en algunas vegetales, uno de los sexos tiene un par de cromosomas diferentes, que están implicados en la determinación del sexo. Por ejemplo, tanto en *Drosophila* como en la especie humana, los machos tienen un cromosoma X y un cromosoma Y, mientras que las hembras tienen dos cromosomas X. Aunque el cromosoma Y tiene que tener una región de apareamiento homólogo con el cromosoma X, ya que los dos sufren sinapsis y segregación en la meiosis, la mayor parte del cromosoma Y en la especie humana y en otras especies, se considera relativamente inerte genéticamente. Aunque reconocemos cierto número de genes específicos masculinos en el cromosoma Y humano, carece de copias de la gran mayoría de los genes presentes en el cromosoma X. Por ello, los genes situados en el cromosoma X presentan patrones únicos de herencia en comparación con los genes autosómicos. El término **ligamiento al X** se utiliza para describir tales situaciones.

A continuación nos centraremos en los patrones de herencia que resultan de los genes presentes en el X, pero ausentes en el cromosoma Y. Esta situación da lugar a una modificación de las proporciones mendelianas, que es el tema central de este capítulo.

Ligamiento al X en *Drosophila*

Uno de los primeros casos de ligamiento al X lo encontró Thomas H. Morgan en 1910 al estudiar la mutación ojo *white* de *Drosophila* (Figura 4.11). El color normal del ojo es rojo y dominante sobre el color blanco.

El trabajo de Morgan estableció que el patrón de herencia del carácter ojos blancos estaba claramente relacionado con el sexo de los padres que llevaban el alelo mutante. A diferencia del resultado de un cruce monohíbrido típico, en donde los resultados de F_1 y F_2 eran muy similares, independientemente de qué padre P_1 manifestaba el carácter mutante recesivo, los cruces recíprocos entre moscas de ojos blancos y de ojos rojos no daban los mismos resultados. El análisis de Morgan concluyó que el locus *white* se encuentra en el cromosoma X en lugar de

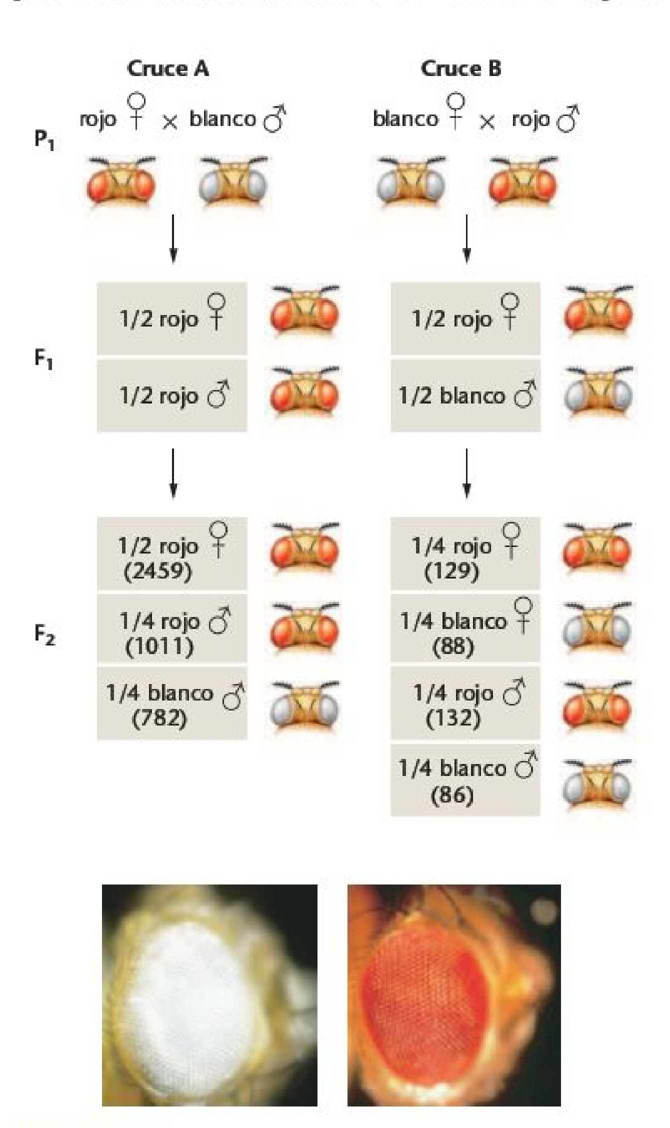


FIGURA 4.11 Resultados de F_1 y F_2 de los cruces recíprocos de T. H. Morgan para la mutación *white* ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*. Los datos reales se muestran en paréntesis. Las fotografías muestran el ojo blanco y el ojo de tipo silvestre de colo rojo ladrillo.

en uno de los autosomas. Por ello, se dice que tanto el gen como el carácter están ligados al X.

En la Figura 4.11 se presentan los resultados de los cruces recíprocos entre moscas de ojos blancos y moscas de ojos rojos. Las diferencias obvias en las proporciones fenotípicas, tanto en F_1 como en F_2 dependen de si el padre de ojos blancos de P_1 era macho o hembra.

Morgan pudo correlacionar estas observaciones con las diferencias que encontró en la composición de los cromosomas sexuales entre machos y hembras de *Drosophila*. Supuso que en los machos con ojos blancos, el alelo recesivo para ojos blancos se encontraba en el cromosoma X, pero que dicho locus no se encontraba en el cromosoma Y. Así las hembras disponían de dos loci génicos, uno en cada cromosoma X, mientras que los machos disponían de un solo locus génico en su único cromosoma X.

La interpretación de Morgan de la herencia ligada al X, que se presenta en la Figura 4.12, proporciona una explicación teórica adecuada de sus resultados. Debido a que el cromosoma Y carece de homología para la mayoría de los genes que se encuentran en el cromosoma X, cualquier alelo presente en el cromosoma X de los machos se expresará directamente en el fenotipo. Como los machos no pueden ser ni homozigotos ni heterozigotos para genes ligados al X, esta situación se denomina **hemizigosis**. En tal caso, no hay alelos alternativos presentes y el concepto de dominancia y recesividad es irrelevante.

Un resultado del ligamiento al X es el **patrón cruzado de herencia**, en donde los caracteres fenotípicos controlados por genes recesivos ligados al X pasan de madres homozigotas a todos los hijos varones. Este patrón ocurre debido a que las hembras que manifiestan un carácter recesivo tienen que tener alelos mutantes en ambos cromosomas X. Debido a que los descendientes masculinos reciben uno de los dos cromosomas X de la madre, y son hemizigotos para todos los alelos presentes en dicho cromosoma X, todos los hijos varones expresarán el mismo carácter recesivo ligado al X, como su madre. Este patrón de herencia queda claro en la genealogía de la Figura 4.13.

Además de documentar el fenómeno de ligamiento al X, el trabajo de Morgan ha tenido gran significado histórico. Hacia

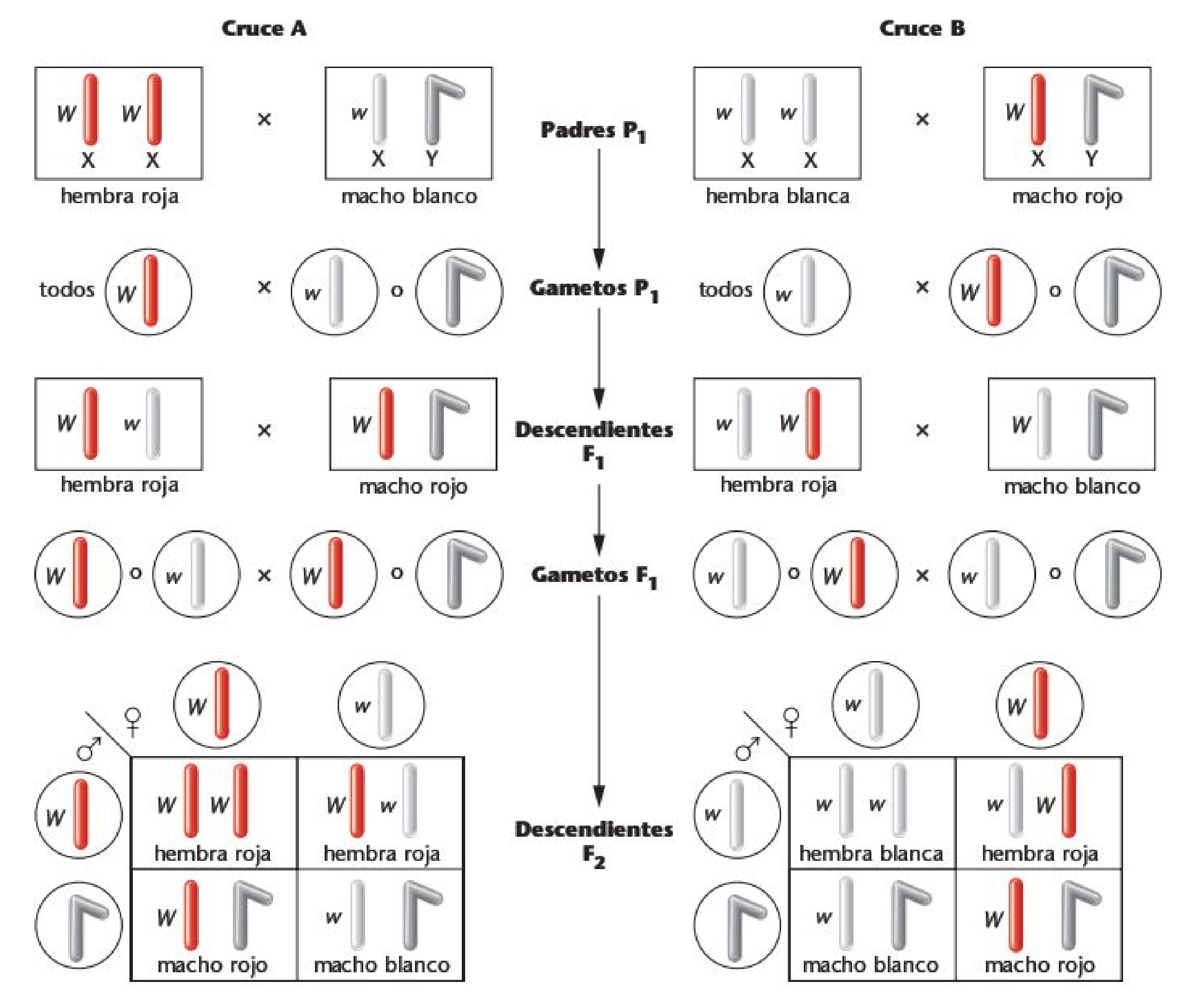


FIGURA 4.12 Explicación cromosómica de los resultados de los cruces ligados al X de la Figura 4.11.

1910, la correlación entre el trabajo de Mendel y el comportamiento de los cromosomas en la meiosis había proporcionado las bases para la **teoría cromosómica de la herencia**, tal como postularon Sutton y Boveri. (Véase el Capítulo 2.) El trabajo de Morgan, y posteriormente los de su discípulo Calvin Bridges, que proporcionaron pruebas directas de que los genes se transmiten situados en cromosomas concretos, se consideran la primera prueba experimental sólida en apoyo de esta teoría. En las siguientes dos décadas, los resultados de la investigación inspirada en estos descubrimientos proporcionaron pruebas irrefutables en apoyo de esta teoría.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que existe ligamiento al X y que genes concretos están localizados en los cromosomas que determinan el sexo?

Ligamiento al X en la especie humana

En la especie humana se reconocen muchos genes, y los respectivos caracteres controlados por ellos, ligados al cromosoma X. Estos caracteres ligados al X se pueden identificar fácilmente en las genealogías debido a su patrón cruzado de herencia. En la Figura 4.13 se presenta una genealogía de una forma de ceguera para los colores en la especie humana. La madre de la generación I pasa el carácter a todos sus hijos varones, pero a ninguna de sus hijas. Si los descendientes de la generación II se casan con individuos normales, los hijos con ceguera para los colores darán lugar a que todos los descendientes, varones o mujeres, sean normales (III-1, 2 y 3); las hijas con visión normal darán lugar a hijas con visión normal (III-4, 6 y 7) e hijos tanto ciegos para los colores (III-8) como normales (III-5).

Como se muestra en la Tabla 4.3, en la especie humana se han identificado muchos genes ligados al cromosoma X. Por ejemplo, los genes que controlan dos tipos de hemofilia y de distrofia muscular están localizados en el cromosoma X. Además hay muchos genes que regulan enzimas ligados al X. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la hipoxantin-guanosin-fosforibosil transferasa son dos ejemplos. En el último caso, el grave síndrome de Lesch-Nyhan (que se discutirá más adelante en este capítulo) se produce por la forma mutante de un producto génico ligado al X.

Ahora resuelva esto

En el problema 4.32 de la página 107 se le pide que determine si cada una de las tres genealogías están de acuerdo con el ligamiento al X.

Sugerencia: En el ligamiento al X, debido a la hemizigosis, el genotipo de los machos se deduce directamente. Por consiguiente, la clave para resolver este tipo de problemas es considerar los genotipos posibles de las hembras que no expresan el carácter.

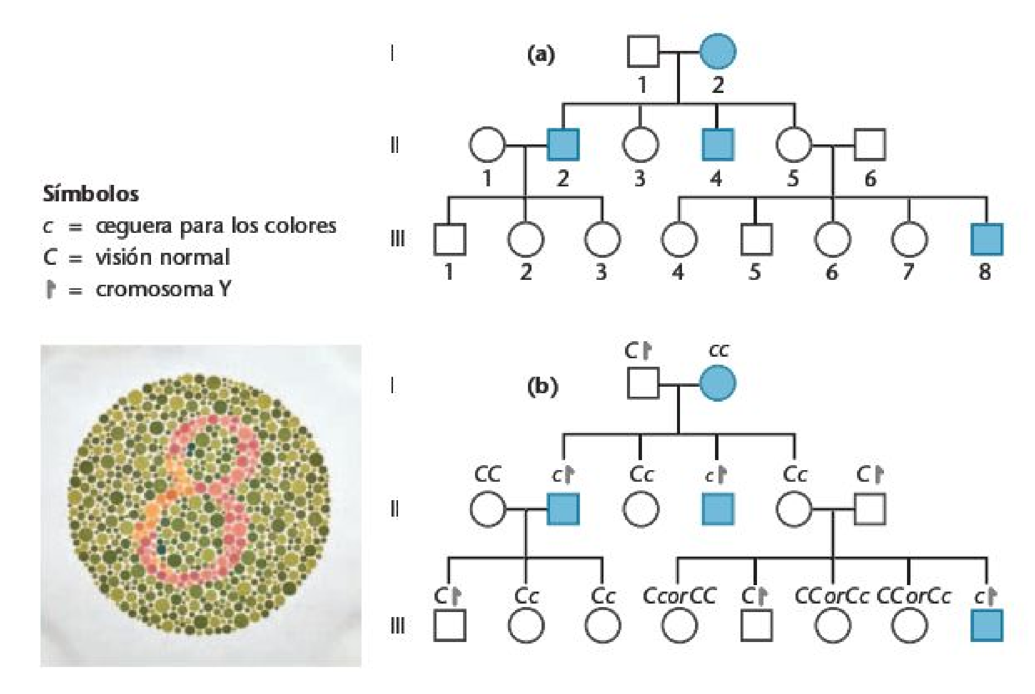


FIGURA 4.13 (a) Genealogía en la especie humana del carácter ceguera para los colores ligado al sexo. (b) Los genotipos más probables de cada individuo de la genealogía. La fotografía pertenece a la carta de Ishihara para ciegos para los colores. Los individuos ciegos para los colores rojo y verde ven un 3 en lugar del 8 que visualizan aquellos que tienen visión normal para los colores.

TABLA 4.3 CARACTERES LIGADOS AL X EN LA ESPECIE HUMANA

Anomalía	Características
Ceguera para los colores, tipo deutan	Insensibilidad a la luz verde
Ceguera para los colores, tipo protan	Insensibilidad a la luz roja
Enfermedad de Fabry	Deficiencia de la galactosidasa A; defectos en corazón y riñones, muerte temprana
Deficiencia de la G-6-PD	Deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; reacción anémica grave después de la ingestión de primaquinas en sustancias química o en ciertos alimentos, como las habas
Hemofilia A	Forma clásica de la deficiencia en la coagulación sanguínea; carencia del factor de coagulación VIII
Hemofilia B	Deficiencia del factor de coagulación IX; enfermedad «Christmas»
Síndrome de Hunter	Enfermedad del almacenamiento de mucopolisacáridos producida por la deficiencia en la enzima iduronato sulfatasa; estatura baja, dedos como garras, rasgos faciales toscos, deterioro mental lento y sordera
Ictiosis	Deficiencia de la enzima esteroide sulfatasa; piel reseca y escamosa, particularmente en las extremidades
Síndrome de Lesch-Nyham	Deficiencia de la enzima hipoxantin-guanosin fosforibosil transferasa (HPRT), que da lugar a retraso mental y motor, automutilación y muerte temprana
Distrofia muscular	Enfermedad progresiva, que acorta la vida, caracterizada por degeneración muscular y debilidad (tipo Duchenne) a veces asociada con retraso mental; deficiencia de la proteína distrofina

Debido al modo en el que los genes ligados al X se transmiten, algunas circunstancias no usuales pueden ir asociadas con anomalías recesivas ligadas al X, cuando se las compara con anomalías autosómicas. Por ejemplo, si una anomalía ligada al X debilita o es letal para el individuo afectado antes de que se reproduzca, la anomalía se da exclusivamente en los varones. Esto es así porque el origen único de alelos letales en la población son las mujeres heterozigotas que son «portadoras» y que no expresan el trastorno. Ellas pasan el alelo a la mitad de sus hijos varones, que desarrollan la enfermedad debido a que son hemizigotos, pero que muy raramente se reproducen. Las mujeres heterozigotas también pasan el alelo a la mitad de sus hijas que, como sus madres, se convierten en portadoras, pero no desarrollan la enfermedad. Un ejemplo de tal enfermedad ligada al X en la especie humana es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la enfermedad de Lesch-Nyhan. (Vea el recuadro más abajo.) La DMD comienza a manifestarse antes de los 6 años y es a menudo letal alrededor de los 20 años. Los varones afectados son incapaces de tener descendencia.

4.11 En la herencia limitada e influenciada por el sexo, el sexo del individuo influye en el fenotipo

En algunos casos, la expresión de un fenotipo concreto se encuentra estrictamente limitada a un sexo; en otros, el sexo de un individuo influye en la expresión de un fenotipo que no está limitado a uno u otro sexo. Esta distinción diferencia la **herencia limitada por el sexo** de la **herencia influenciada por el sexo.**

En ambos tipos de herencia, los genes autonómicos son responsables de la existencia de fenotipos alternativos, pero la expresión de estos genes depende de la constitución hormonal del individuo. Así, el genotipo heterozigoto puede manifestar un fenotipo en los machos y el alternativo en las hembras. Por ejemplo, en las aves de corral, la cola y las plumas del cuello son a menudo muy diferentes en hembras y en machos (Figura 4.14), demostrando herencia limitada por el sexo. El plumaje del gallo es más largo, curvado y puntiagudo que el de la gallina, que es más corto y redondeado. La herencia de estos fenotipos depende de un único par de alelos autonómicos, cuya



FIGURA 4.14 Plumaje de gallina (izquierda) y de gallo (derecha) en las aves de corral. Las plumas en la gallina son más cortas y menos curvadas.

El síndrome de Lesch-Nyhan: Las bases moleculares de una rara enfermedad recesiva ligada al X

El síndrome de Lesch-Nyhan (LNS) es una enfermedad devastadora que comienza a manifestarse en bebes de 3 a 6 meses de edad, cuando aparecen partículas naranjas (denominadas a veces arena naranja) en la orina y manchan el pañal de los bebes afectados. Estas partículas de la orina son cristales de urato y son el presagio de muchas dificultades futuras que finalmente darán lugar a una muerte prematura. El LNS afecta sólo a varones y es el resultado de la pérdida completa, o casi, de la actividad de una enzima esencial, la **hipoxantin-guanosín fosforibosil transferasa (HPRT)**. Esta enzima interviene en el reciclaje metabólico de las purinas, uno de los dos tipos principales de bases nitrogenadas que forman los nucleótidos del DNA. Aunque las purinas adenina y guanina se pueden sintetizar a partir de componentes químicos básicos, los mamíferos han desarrollado la capacidad de aprovecharlos del DNA que esta siendo degradado, recuperándolos en la forma de hipoxantina. Bajo la acción de la HPRT, la hipoxantina se puede convertir de nuevo en nucleótidos con adenina o guanina. Cuando este mecanismo falla por mutación, el exceso de hipoxantina se convierte en ácido úrico que se acumula más allá de la capacidad que tiene el organismo para excretarlo.

Esta anomalía, llamada metabólica o bioquímica, tiene numerosos efectos, siendo los más graves el retraso mental, ataques y enérgicos movimientos espasmódicos incontrolados (parecidos a los de la parálisis cerebral) que incluyen automutilaciones de los dedos y de los labios. Los pacientes requieren un cuidado continuo durante toda su vida y casi siempre mueren antes de los 30 años, normalmente como consecuencia de fallos renales. En febrero de 2004, el paciente de LNS vivo más viejo, Philip Barker, celebraba su 33 aniversario en Bayview, New York.

El gen implicado en el LNS está localizado en el brazo largo del cromosoma X y consta de 44.000 pares de bases (44 Kb). Sin embargo, el producto génico tiene sólo 218 aminoácidos, requiriendo sólo 654 pares de bases para su codificación. El análisis de la versión clonada del gen revela que tiene 9 exones y 8 intrones. Los ratones tienen un gen casi idéntico, que es homólogo del gen humano en un 95 por ciento.

En individuos normales la enzima es ubicua en los tejidos corporales, pero se encuentra en gran concentración en los nódulos basales de las células cerebrales. No hay duda de que esto está de alguna manera relacionado con el fenotipo de comportamiento que caracteriza a los pacientes del LNS, que carecen de actividad de la enzima en el cerebro y en cualquier otra parte de su organismo. A pesar de los grandes esfuerzos en investigación, no se conoce curación. Ya que el gen responsable es recesivo y ligado al X y que los varones afectados nunca se reproducen, las mujeres, aunque pueden ser portadoras del gen mutante, nunca se convierten en homozigotas y por ello nunca desarrollan el LNS.

expresión está modificada por las hormonas sexuales del individuo. Como se muestra a continuación, el plumaje del tipo gallina se debe al alelo dominante *H*:

Genotipo	Fenotipo	
	♀	♂
HH	Plumaje de gallina	Plumaje de gallina
Hh	Plumaje de gallina	Plumaje de gallina
hh	Plumaje de gallina	Plumaje de gallo

Sin embargo, independientemente de la presencia en homozigosis del alelo recesivo *h*, todas las hembras tienen el plumaje de gallina, Sólo los machos que son homozigotos *hh* tienen el plumaje de gallo.

En ciertas variedades de aves de corral, ha quedado fijado en la población el alelo para plumaje de gallina o para plumaje de gallo. En la variedad *Leghorn*, todos los individuos son de genotipo hh; por ello machos y hembras se diferencian por su distinto plumaje. Las gallinas enanas *Seabright* son todas *HH*, no presentando diferencias sexuales en el plumaje.

Otro caso de herencia limitada por el sexo se refiere a los genes autosómicos responsables de la producción de leche en el ganado vacuno. Independientemente del genotipo que influye en la cantidad de leche producida, estos genes obviamente se expresan sólo en las vacas.



El Problema 4.33 de la página 107 se refiere a la herencia de manchas coloreadas en el ganado vacuno y se le pide que analice las proporciones de F_1 y F_2 para determinar el modo de herencia.

Sugerencia: Advierta especialmente que los datos están diferenciados en descendientes machos y hembras y que las proporciones en F_2 varían de acuerdo con el sexo (p.e., 3/8 de los machos son caoba mientras que sólo 1/8 de las hembras lo son, etc.). Esto le avisa inmediatamente de que hay que considerar la posible influencia de las diferencias sexuales en el resultado de los cruces. En este caso, se debería considerar si pudiera estar implicada una herencia ligada al X, limitada por el sexo o influenciada por el sexo.

Entre los casos de herencia influenciada por el sexo se encuentra el patrón de calvicie en la especie humana, la for-

mación de los cuernos en ciertas razas de ovejas (p.e., las ovejas *Dorsett Horn*), y ciertos patrones de pelaje en el ganado vacuno. En tales casos, son genes autosómicos los responsables de los fenotipos alternativos manifestados por hembras y machos, pero la expresión de estos genes depende de la constitución hormonal de los individuos. Así, el genotipo heterozigoto puede manifestar un fenotipo en un sexo y el fenotipo alternativo en el otro. Por ejemplo, la calvicie en la especie humana, en donde el pelo es muy fino, o no hay, en la parte superior de la cabeza (Figura 4.15), se hereda del siguiente modo:

Genotipo	Fenotipo	
	♀	♂
BB	Calvo	Calvo
Bb	No calvo	Calvo
bb	No calvo	No calvo

Aun cuando las mujeres pueden presentar calvicie, este fenotipo es mucho más prevalente en los varones. Cuando las mujeres heredan el genotipo *BB*, el fenotipo es mucho menos pronunciado que en los varones y se expresa más tarde.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo aprendimos a distinguir entre herencia ligada al X y limitada por el sexo?

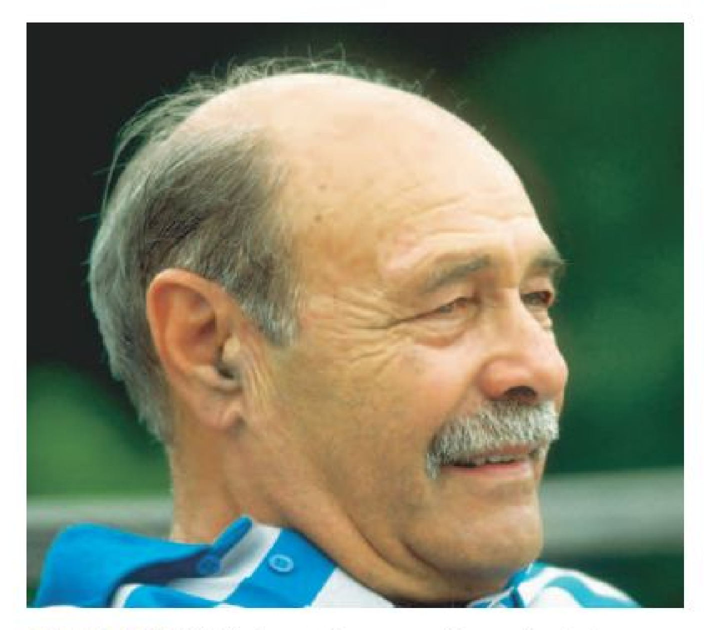


FIGURA 4.15 Patrón de calvicie, un carácter autosómico influenciado por el sexo en la especie humana.

4.12 La expresión fenotípica no siempre es el reflejo directo del genotipo

Concluimos este capítulo considerando la *expresión fenotípica*. En los Capítulos 2 y 3 asumimos que el genotipo de un organismo se expresa siempre directamente en su fenotipo. Por ejemplo, los guisantes homozigotos para el alelo recesivo *d* (*dd*) siempre serán enanos.

Hemos discutido la expresión del gen como si los genes actuasen en un sistema cerrado, de «caja negra», en el que la presencia o ausencia de productos funcionales determina directamente el fenotipo global de un individuo. La situación es realmente mucho más compleja. La mayoría de los productos génicos actúan en el medio interno de la célula y las células interactúan unas con otras de varios modos. Además, el organismo debe sobrevivir ante diversas influencias ambientales. Así, la expresión del gen y el fenotipo resultante son modificados a menudo por la interacción entre el genotipo concreto del individuo y el ambiente interno y externo.

El grado de influencia ambiental puede variar desde inapreciable hasta débil o muy elevado. Las interacciones débiles son mucho más difíciles de detectar y documentar y conducen al no resuelto conflicto «naturaleza-crianza» en el que los científicos debaten la importancia relativa de los genes frente al ambiente —normalmente de modo no convincente. En la sección final de este capítulo, trataremos algunas de las variables que se sabe modifican la expresión del gen.

Penetración y expresividad

Algunos genotipos mutantes siempre se expresan con un fenotipo claro, mientras que otros dan lugar a una proporción de individuos cuyos fenotipos no se pueden distinguir del normal (tipo silvestre). El grado de expresión de un carácter concreto se puede estudiar cuantitativamente, determinando la penetración y expresividad del genotipo en estudio. El porcentaje de individuos que muestran, al menos en algún grado, la expresión de un genotipo mutante define la **penetración** de la mutación. Por ejemplo, la expresión fenotípica de muchos alelos mutantes de *Drosophila* no se puede distinguir del tipo silvestre. Si el 15 por ciento de las moscas mutantes presentan la apariencia silvestre, se dice que el gen mutante tiene una penetración del 85 por ciento.

En contraste, la **expresividad** refleja el *grado de expresión* del genotipo mutante. Moscas homozigotas para el gen mutante recesivo *eyeless* dan lugar a fenotipos que van desde la presencia de ojos normales, a un reducción parcial de su tamaño hasta la ausencia completa de uno o de ambos ojos (Figura 4.16). Aunque la reducción media del tamaño del ojo es de un cuarto a un medio, el rango de expresividad va desde la ausencia completa de ambos ojos a ojos completamente normales.

Ejemplos parecidos al de la expresión del fenotipo en *eyeless* han proporcionado las bases para diseñar experimentos

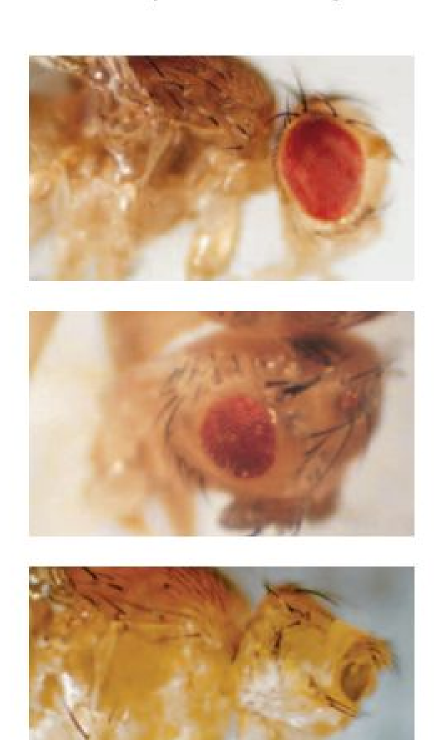


FIGURA 4.16 Expresividad variable que presenta la mutación *eyeless* de *Drosophila*. Gradación del rango fenotípico, desde el tipo silvestre a la reducción parcial y a la ausencia de ojos.

y determinar las causas de la variación fenotípica. Si el ambiente del laboratorio se mantiene constante y todavía se observa una amplia variación, otros genes pueden estar influyendo o modificando el fenotipo *eyeless*. Por otro lado, si el fondo genético no es la causa de la variación fenotípica, pueden estar implicados factores ambientales como la temperatura, la humedad o la nutrición. En el caso del fenotipo *eyeless*, se ha determinado experimentalmente que tanto el fondo genético como los factores ambientales influyen en su expresión.

Fondo genético: Supresión y efectos de posición

Aunque es difícil estimar el efecto específico del **fondo genético** y la expresión de un gen responsable para determinar un fenotipo potencial, se han caracterizados muy bien dos de los efectos del fondo genético.

Primero, la expresión de otros genes del genoma puede tener efecto en el fenotipo producido por el gen en cuestión. El fenómeno de la **supresión genética** es un ejemplo. Genes mutantes, como *suppressor of sable* (*su-s*), *suppressor of forked* (*su-f*) y *suppressor of Hairy-wing* (*su-Hw*) de *Drosophila*, restauran parcial o completamente el fenotipo normal de un organismo homozigoto (o hemizigoto) para las mutaciones *sable*, *forked* y *Hairy-wing*, respectivamente. Por ejemplo, moscas hemizigotas tanto para *forked* (una mutación de las quetas) como para *su-f* tienen quetas normales. En cada caso, el gen supresor da lugar a la reversión completa de la expresión fenotípica esperada de la mutación original. Los genes supresores son ejemplos excelentes del fondo genético que modifica efectos génicos primarios.

Segundo, la localización física de un gen en relación con otro material genético puede influir en su expresión. Tal situación se denomina **efecto de posición**. Por ejemplo, si una región cromosómica se recoloca o se reordena (suceso llamado de translocación o de inversión), la expresión normal de los genes de dicha región cromosómica puede quedar modificada. Esto es especialmente cierto si el gen se sitúa en o cerca de ciertas áreas de los cromosomas que se condensan prematuramente y son genéticamente inertes, que reciben el nombre de **heterocromáticas**.

Un ejemplo de tal efecto de posición se da en hembras de *Drosophila*, heterozigotas para el mutante de color de ojos *white* (*w*), recesivo y ligado al X. El genotipo w^+/w da lugar normalmente a un color de ojos rojo ladrillo de tipo silvestre. Sin embargo, si la región del cromosoma X que tiene el alelo silvestre w^+ se transloca de tal manera que quede cerca de una región heterocromática, se modifica la expresión del alelo w^+. En lugar de tener un color rojo, los ojos son variegados, o moteados, con manchas rojas y blancas (Figura 4.17). Por consiguiente, después de la translocación, el efecto dominante del alelo normal w^+ es intermitente. Se produce un efecto de posición similar si una región heterocromática se recoloca junto al locus *white* en el cromosoma X. Aparentemente, las regio-

(a)



(b)



FIGURA 4.17 Efecto de posición, tal como se observa en el fenotipo ocular en dos hembras de *Drosophila*, heterozigotas para el gen *white*. (a) Fenotipo dominante normal, con los ojos de color rojo ladrillo. (b) Color variegado del ojo, motivado por la reordenación del gen *white* en otra localización del genoma.

nes heterocromáticas inhiben la expresión de los genes adyacentes. Loci de muchos otros organismos también presentan efecto de posición, proporcionando pruebas de que la alteración de la disposición normal de la información genética puede modificar su expresión.

Efectos de la temperatura

Debido a que la actividad química depende de la energía cinética de las sustancias que reaccionan, que a su vez depende de la temperatura circundante, podemos esperar que la temperatura influya en los fenotipos. Un ejemplo es la hierba del asno, que produce flores rojas cuando se cultiva a 23ºC y flores blancas a 18ºC. Un ejemplo incluso más espectacular se observa en los gatos siameses y en los conejos Himalaya, que presentan pelaje oscuro en ciertas partes del cuerpo en donde la temperatura corporal es ligeramente más fría, especialmente en la nariz, orejas y patas (Figura 4.18). En estos casos, parece que la enzima silvestre responsable de la formación de pigmento es funcional a las temperaturas más bajas que hay en las extremidades, pero pierde su función catalítica a las temperaturas ligeramente más elevadas que se encuentran en el resto del cuerpo.

Se dice que las mutaciones que están afectadas por la temperatura son **condicionales** y se denominan **sensibles a la temperatura**. Se conocen ejemplos en los virus y en una serie de organismos, como bacterias, hongos y *Drosophila*. En casos extremos, un organismo portador de un alelo mutante puede expresar un fenotipo mutante cuando se cultiva a una temperatura, pero expresan el fenotipo silvestre cuando se cultiva a otra temperatura. Este tipo de efecto de la temperatura es útil para estudiar mutaciones que interrumpen procesos esenciales en el desarrollo y por ello son normalmente detrimentales para el organismo. Por ejemplo, si virus bacterianos que llevan ciertas mutaciones sensibles a la temperatura infectan a una bacteria cultivada a 42ºC, que recibe el nombre de *condición restrictiva*, la infección progresa hasta que el producto génico esencial es necesario (p.e. para el ensamblaje del virus) y entonces se detiene. Si se cultiva en una *condición permisiva* a 25ºC, el producto génico será funcional, la infección progresará normalmente y se producirán nuevos virus. El uso de mutaciones sensibles a la temperatura, que pueden inducirse y aislarse, ha potenciado enormemente el estudio de la genética de los virus.

Otro caso se refiere a genes, presentes en todos los organismos estudiados, que se activan solo cuando los organismos se encuentran en condiciones de stress por elevadas temperaturas ambientales. Descubiertos primero en *Drosophila*, los llamados **genes del choque térmico**, son responsables de la producción de un grupo de proteínas que se cree tienen funciones protectoras ante el stress de calor. La activación coordinada de estos genes en eucariotas se atribuye a elementos promocionales compartidos implicados en su regulación transcripcional.

Efectos de la nutrición

Otro ejemplo en donde el fenotipo no es el reflejo directo del genotipo del organismo es el de las **mutaciones nutricionales**. En los microorganismos, son muy frecuentes las mutaciones que evitan la síntesis de moléculas nutritivas, como cuando se inactiva una enzima esencial de una ruta metabólica. Un microorganismo que lleve tal mutación se denomina **auxótrofo**. Si no se puede sintetizar el producto final de una ruta bioquí-

(a)



(b)

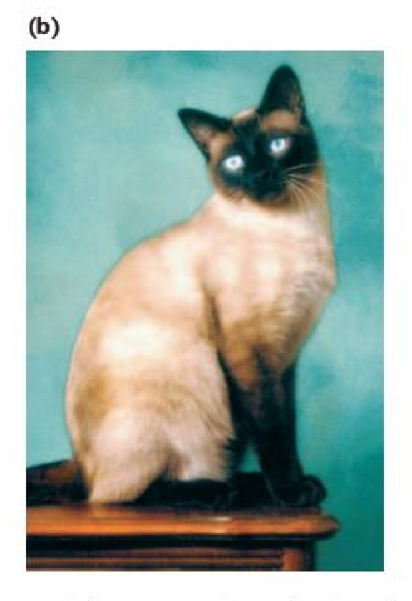


FIGURA 4.18 (a) Conejo Himalaya. (b) Gato siamés. Ambos presentan pelaje oscuro en las orejas, la nariz y las patas. Este patrón se debe a la expresión de un alelo sensible a la temperatura, responsable de la producción de pigmento en las extremidades, en donde hay menor temperatura, que se inactiva a temperaturas ligeramente superiores.

mica, y si dicha molécula es esencial para el crecimiento y el desarrollo normales, la mutación impedirá el crecimiento y puede ser letal. Por ejemplo, si el moho del pan *Neurospora* no puede sintetizar el aminoácido leucina, no se podrán sintetizar proteínas. Si hay leucina en el medio de cultivo, el efecto detrimental se superará. Los mutantes nutricionales han sido cruciales en el estudio de la genética bacteriana y sirvieron de base para que George Beadle y Edward Tatum propusieran a principios de los años 1940 que una de las funciones de un gen es producir una enzima. (Véase el Capítulo 15.)

En la especie humana se conocen una serie de circunstancias ligeramente diferentes. La presencia o ausencia de ciertas sustancias en la dieta, que los individuos normales pueden consumir sin perjuicios, pueden afectar gravemente a individuos con constituciones genéticas anormales. A menudo, una mutación puede evitar que un individuo metabolice una sustancia que normalmente se encuentra en la dieta. Por ejemplo, los afectados por el trastorno genético **fenilcetonuria** no pueden metabolizar el aminoácido fenilalanina. Aquellos con **galactosemia** no pueden metabolizar la galactosa. Sin embargo, si se reduce drásticamente, o se elimina, la ingestión de la molécula correspondiente en la dieta, el fenotipo asociado puede mejorarse.

El caso, bastante corriente, de la **intolerancia a la lactosa,** por el que los individuos no toleran el azúcar lactosa de la leche, es un ejemplo de los principios generales implicados. La lactosa es un disacárido que consta de una molécula de glucosa unida a otra de galactosa y que representa el 7 por ciento en la leche humana y el 4 por ciento en la leche de vaca. Para metabolizar la lactosa, la especie humana necesita la enzima **lactasa**, que escinde al disacárido. En los primeros años de vida se producen cantidades adecuadas de lactasa. Sin embargo, en muchas personas, el nivel de esta enzima cae pronto drásticamente. Estos individuos, cuando llegan a adulto, no pueden tolerar la leche. Los principales efectos fenotípicos son diarreas intestinales graves, flatulencia y calambres abdominales. Esta situación es particularmente prevalente en esquimales, africanos, asiáticos y nativos americanos, aunque no está limitada sólo a estos. En alguna de estas culturas la leche normalmente se convierte en queso, mantequilla y yogur, en donde la cantidad de lactosa se reduce significativamente y casi se pueden eliminar sus efectos adversos. En los Estados Unidos se dispone comercialmente de leche baja en lactosa y, para ayudar, la digestión de otros alimentos que contienen lactosa, la lactasa es ahora un producto comercial que se puede ingerir.

Inicio de la expresión génica

No todos los caracteres se expresan al mismo tiempo a lo largo de la vida de un organismo. En muchos casos, la edad a la que el gen se expresa se corresponde con la secuencia normal del crecimiento y desarrollo. En la especie humana, las fases prenatal, infantil, juvenil y adulta requieren informaciones genéticas diferentes. Por ello, muchas enfermedades hereditarias graves a menudo no se manifiestan hasta después del nacimiento. Por ejemplo, la **enfermedad de Tay-Sachs**, que se hereda como autosómica recesiva, es una enfermedad letal del metabolismo lipídico, debido a una enzima anormal, la hexosaminidasa A. Los recién nacidos parecen normales durante los primeros cinco meses. Luego se producen retrasos en el desarrollo, parálisis y ceguera y la mayoría de los niños afectados muere a la edad de tres años.

El **síndrome de Lesch-Nyhan** (véase la página 84), que se hereda como una enfermedad recesiva ligada al X, se caracteriza por un metabolismo anormal de los ácidos nucleicos (recuperación bioquímica de las bases púricas nitrogenadas), dando lugar a la acumulación de ácido úrico en sangre y tejidos, retraso mental, parálisis y automutilación de labios y dedos. La enfermedad se debe a la mutación del gen que codifica para la hipoxantín-guanosín fosforribosil transferasa (HPRT). Los recién nacidos son normales hasta los seis u ocho meses de edad antes de la aparición de los primeros síntomas.

Otro ejemplo es el de la **distrofia muscular de Duchenne (DMD)**, una enfermedad recesiva ligada al X asociada con una progresiva degradación muscular. Normalmente se diagnostica entre los tres y los cinco años de edad. Incluso con intervención médica, la enfermedad es a menudo mortal a la edad de veinte años.

Quizá la más variable de todas las enfermedades hereditarias humanas respecto de la edad de inicio es la **enfermedad de Huntington**. Se hereda como autosómica dominante y afecta a los lóbulos frontales del cortex cerebral, en donde durante más de una década se da una muerte celular progresiva. El deterioro del cerebro viene acompañado por movimientos espasmódicos incontrolados, deterioro emocional e intelectual y finalmente la muerte. Aunque su inicio se ha señalado en cualquier edad, se da más frecuentemente entre los 30 y los 50 años, con una edad media de aparición a los 38 años.

Observaciones parecidas apoyan el concepto de que la expresión crítica de los genes normales varía a lo largo del ciclo biológico de los organismos, incluidos los humanos. Los productos génicos pueden jugar papeles más esenciales en ciertos momentos. Además, es probable que el ambiente fisiológico interno de un organismo cambie con la edad.

Anticipación genética

El interés en estudiar el inicio genético de la expresión fenotípica se ha intensificado con el descubrimiento de trastornos heredables que se *manifiestan a una edad progresivamente más temprana y que la gravedad de la enfermedad aumenta en generaciones sucesivas.* Este fenómeno se denomina **anticipación genética**

La **distrofia miotónica**, el tipo más corriente de distrofia muscular en los adultos, ilustra muy bien la anticipación genética. Los individuos afectados con esta enfermedad autosómica dominante, presentan una enorme variación en la gravedad de los síntomas. Los individuos afectados débilmente desarro-

llan cataratas en la madurez, con poca o ninguna debilidad muscular. Los individuos afectados gravemente muestran una mayor debilidad, miotonía (hiperexcitabilidad muscular) y pueden tener retraso mental. En su forma más extrema, la enfermedad es mortal justo después del nacimiento. Se generó un enorme interés en 1989, cuando C. J. Howeler y colaboradores confirmaron la correlación entre el aumento de la gravedad y el inicio temprano. Los investigadores estudiaron 61 parejas padres-hijos que manifestaban la enfermedad y, en 60 de los casos, la edad del inicio era más temprana o la gravedad mayor en los hijos que en sus padres.

En 1992 se pudo formular una explicación tanto de las causas a nivel molecular de la mutación responsable de la DM como de las bases de la anticipación genética. Como veremos en el Capítulo 15, una corta secuencia de DNA (3 nucleótidos) del gen DM está repetida un número variable de veces y es inestable. Normalmente los individuos tienen de 5 a 35 copias de esta secuencia, los individuos minimamente afectados presentan alrededor de 150 copias y los gravemente afectados poseen hasta 1.500 copias. La observación más notable fue que, en generaciones sucesivas de individuos DM, el segmento con la repetición aumenta de tamaño. Aunque no esta todavía totalmente claro de que manera la expansión en tamaño afecta al inicio de la expresión fenotípica, el incremento en el número de copias se acepta como la causa de la anticipación genética de esta enfermedad. Otros trastornos hereditarios humanos, como el síndrome del X frágil, la enfermedad de Kennedy y la enfermedad de Huntington, también presentan asociación entre el tamaño de regiones concretas del gen responsable y la gravedad de la enfermedad. Volveremos a este tema cuando discutamos en detalle la explicación molecular en el Capítulo 15.

Impronta genómica (paterna)

Nuestro último ejemplo de modificación de las leyes de la herencia de Mendel, se refiere al caso en donde la expresión fenotípica varia dependiendo estrictamente del origen paterno o materno del cromosoma que lleva un gen concreto, fenómeno llamado **impronta[3] genómica** (o **paterna**). En algunas especies, ciertas regiones de los cromosomas y los genes que se encuentran dentro de estas, parecen tener memoria, o una retener una «señal», de su origen paterno, que influye en si genes concretos se expresan o permanecen silenciosos genéticamente —es decir, no se expresan.

Se cree que la impronta ocurre antes o durante la formación de los gametos, dando lugar a genes (o regiones cromosómicas) marcados diferencialmente en el tejido que origina esperma respecto del tejido que forma óvulos. El proceso es claramente distinto de la mutación, ya que la impronta puede revertirse en sucesivas generaciones cuando los genes pasan de la madre al hijo y a la nieta y así sucesivamente.

Un ejemplo de impronta es la inactivación de uno de los cromosomas X en las hembras de mamífero. En los ratones, antes del desarrollo del embrión, se da impronta en los tejidos de tal manera que el cromosoma X de origen paterno es inactivado genéticamente en todas las células, mientras que los genes del cromosoma X materno permanecen genéticamente activos. Cuando posteriormente se inicia el desarrollo del embrión, la impronta se «relaja» y se produce inactivación aleatoria del cromosoma X paterno *o* materno.

En 1991, informaciones más concreta demostraron que tres genes específicos del ratón sufren impronta. Uno de ellos es el gen que codifica el factor II (*Igf2*) de crecimiento, parecido a la insulina. Un ratón que lleva dos alelos normales de este gen tiene tamaño normal, mientras que un ratón que lleva los dos alelos mutantes carece del factor de crecimiento y es enano. El tamaño de un ratón heterozigoto —un alelo normal y otro mutante (Figura 4.19)— depende del origen paterno del alelo normal. El ratón tiene tamaño normal si el alelo normal viene del padre, pero es enano si el alelo normal viene de la madre. De esto se puede deducir que el alelo normal del gen *Igf2* es marcado para funcionar deficientemente durante la producción de los óvulos en las hembras, pero funciona normalmente cuando pasa a través del tejido productor de esperma de los machos.

La impronta sigue dependiendo de si el gen pasa a la siguiente generación a través del tejido formador de esperma o del tejido formador de óvulos. Por ejemplo, un macho heterozigoto de tamaño normal pasará, como promedio, un alelo de tipo silvestre con funcionamiento normal a la mitad de sus descendientes que contrarrestará al alelo mutante recibido de la madre. En la especie humana hay dos trastornos genéticos que se cree están ocasionadas por impronta diferencial de la misma región del cromosoma 15 (15q1). En ambos casos, los trastornos *parece* que se deben a una deleción idéntica de esta región en uno de los miembros del par cromosómico 15. El primer trastorno, el **síndrome de Prader-Willi (SPW),** aparece sólo cuando permanece sin delecionar un cromosoma materno. Se produce un trastorno totalmente diferente, el **síndrome de Angelman (SA),** si solo permanece sin delecionar un cromosoma paterno.

Fenotípicamente, los dos trastornos son claramente diferentes. En el SPW se advierte retraso mental además de una anomalía grave en la alimentación caracterizada por un apetito incontrolable, obesidad, diabetes y retraso en el crecimiento. El síndrome de Angelman da lugar a unas manifestaciones clínicas diferentes que implican tanto al comportamiento como al retraso mental. Se puede concluir que la región 15q1 se marca

---

[4] *Nota del traductor*: en Inglés, *imprinting*. A veces se ha traducido por huella. La definición que da el diccionario de la R.A.E. del término impronta, en su acepción biológica, es casi la traducción literal que da *The Random House Dictionary of the English Language* para la palabra *imprinting*. El término proviene de la etología y es la traducción del término alemán utilizado por vez primera por Konrad Lorenz.

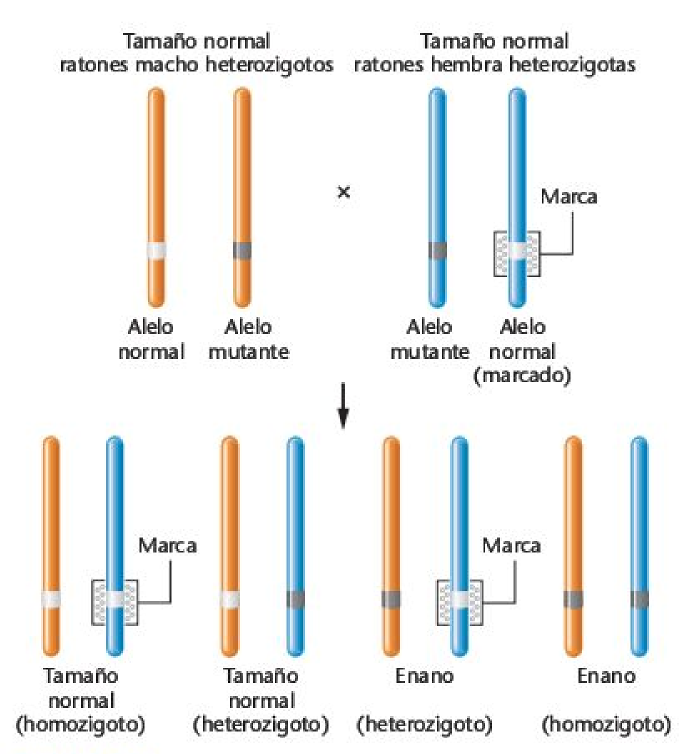


FIGURA 4.19 Efecto de la impronta en el gen *Igf2* del ratón, que da lugar en homozigosis a ratones enanos. Los descendientes heterozigotos que reciben el alelo normal de su padre tienen tamaño normal. Los heterozigotos que reciben el alelo normal de su madre, que ha sido «marcado«, son enanos.

de manera diferente en los gametos masculinos que en los femeninos y que para un desarrollo normal es necesario tanto la región materna como la paterna.

Aunque quedan numerosas cuestiones por resolver en la impronta genómica, esta muy claro en la actualidad que muchos genes se encuentran sujetos a este proceso. Hasta el momento se han identificado más de 50 en los mamíferos. Parece que lo que se marca son regiones de cromosomas en lugar de genes concretos. El mecanismo molecular de la impronta está todavía sujeto a discusión, pero parece comprobado que esta implicada la **metilación del DNA.** En los vertebrados se pueden añadir grupos metilo al carbono en posición 5 de la citosina (véase el Capítulo 10) como consecuencia de la actividad de la enzima DNA metil transferasa. Se añaden grupos metilo cuando a lo largo de la cadena de DNA se encuentra el dinucleótido CpG o grupos de CpG (llamados islas de CpG).

La metilación del DNA es un mecanismo razonable para establecer una impronta molecular, ya que hay alguna evidencia de que un elevado nivel de metilación puede inhibir la actividad génica y que los genes activos (o sus secuencias reguladoras) están a menudo sin metilar. Cualquiera que sea la causa de este fenómeno, es un tema fascinante, y que claramente establece la necesidad de la asimetría epigenética entre el genoma materno y paterno después de la fecundación. Sin duda, el fenómeno de la impronta genómica permanecerá como área activa de investigación en un futuro.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Mejora del destino genético de los perros de raza

Para los amantes de los perros, nada es tan doloroso como ver que un perro se va quedando ciego, sin remedio, mientras lucha por adaptarse a una vida de total oscuridad. Esto es lo que sucede en la atrofia progresiva de la retina (PRA) una enfermedad hereditaria descrita en 1911 en la raza setter Gordon. Desde entonces la PRA se ha detectado en más de 60 razas de perros, como el setter irlandés, collie de frontera, elkhounds noruegos, poodles enanos, schnauzer enanos, cocker spaniels y huskies siberianos.

Para el desarrollo y mantenimiento de una retina saludable se necesitan los productos de muchos genes y un defecto en cualquiera de ellos puede dar lugar a la disfunción de la retina. Décadas de investigación han conducido a la identificación de seis de tales genes (*rcd1, rcd2, erd, Rho, Xpra* y *prcd*) y es probable que se descubran mas. En diferentes razas han mutado genes distintos (p.e., *rcd1* el setter irlandés, *rcd2* en los collies, y *prcd* en muchas de las razas). Cada gen está asociado con una forma diferente de PRA que varía de forma ligeramente diferente en sus síntomas clínicos y ritmo de progresión. La PRA presenta un patrón de herencia recesivo en la mayoría de las razas, pero es dominante en los mastines y ligado al sexo en los huskies siberianos.

Cualquiera que sea la mutación responsable, la PRA es casi diez veces más frecuente en ciertas razas de perros que en razas mezcladas. El desarrollo de las distintas razas de perros ha precisado de una intensa selección de los caracteres deseables, como un tamaño, forma, color y comportamiento concretos. Muchas de las características deseables están determinadas por alelos recesivos. La forma más rápida para aumentar la homozigosis de estos alelos y establecer las características de la población es cruzar parientes próximos, que es probable que lleven los mismos alelos. En la práctica, por ejemplo, los perros se pueden cruzar con su primo o con su abuelo. Muchos criadores también obtienen cientos de descendientes de un único perro que ha conseguido premios en los concursos, en un intento de sacar provecho de notables genealogías. Este «popular

efecto semental», como se ha denominado, aumenta la homozigosis de los alelos en perros de raza.

Desgraciadamente, las generaciones de consanguinidad que han establecido características favorables en los perros de raza, han incrementado también la homozigosis de ciertos alelos recesivos perjudiciales, como el PRA, dando lugar a otras enfermedades hereditarias. Muchas razas están plagadas de displasia de cadera hereditaria, que es particularmente prevalente en los perros pastores alemanes. La sordera y las anomalías renales son enfermedades genéticas corrientes entre los dálmatas. En perros de raza se han caracterizado más de 300 de tales enfermedades y muchas razas tienen predisposición a más de 20 de ellas. De acuerdo con los investigadores de la Universidad de Cornell, los perros de raza sufren de la mayor incidencia de enfermedades hereditarias entre los animales: el 25 por ciento de los 20 millones de perros de raza de América están afectados por una u otra dolencia genética. Aunque las mutaciones son la causa de estas enfermedades genéticas, se está de acuerdo en general que las prácticas de cruce, si no se ejecutan adecuadamente, aumentan la frecuencia de las enfermedades.

La consanguinidad es probablemente la explicación de la elevada frecuencia de la PRA en ciertas razas. Afortunadamente, los avances en la genética de los perros están comenzando a proporcionar nuevas herramientas para el cruce de perros saludables. Desde 1998 existe un test genético para identificar mutaciones del gen *prcd* del cromosoma 9, responsable de la degeneración progresiva de conos y bastones (prcd), la forma más frecuente de la PRA. Este test se está utilizando ahora para identificar a los portadores heterozigotos para mutaciones *prcd* —perros que no presentan síntomas de PRA, pero, que si se cruzan con otros portadores, pasan el carácter a un 25 por ciento de sus descendientes. Eliminando a los portadores de la PRA de los programas de cruce, en los perros de agua portugueses se ha erradicado casi totalmente esta enfermedad y se ha reducido bastante su prevalencia en muchas otras razas. OptiGen, una compañía dedicada exclusivamente a comprobar y evitar enfermedades hereditarias en futuras generaciones de perros de raza, ofrece en la actualidad test basados en sangre de todas las formas conocidas de PRA y se están desarrollando pruebas para enfermedades hereditarias similares. El aumento en la disponibilidad de test genéticos permitirá pronto el diagnóstico de enfermedades antes de que se desarrollen los síntomas, asegurando que los animales que se cruzan están libres de alelos recesivos perjudiciales y con la esperanza de ofrecer solución a los problemas motivados por el pasado siglo de consanguinidad.

Se tardaron muchos años en identificar al *prcd* y otros genes responsables de la PRA. En el futuro, el aislamiento de genes responsables de enfermedades hereditarias caninas será más rápido gracias al Proyecto Genoma Canino, un esfuerzo en colaboración de científicos de las Universidades de California y Oregon, del centro Hutchinson de investigación del cáncer de Seattle y de otros centros. En 2003 se completó un mapa genético de los 39 cromosomas del perro y demostró que el genoma del perro es más pequeño que el genoma humano, aunque contiene más de 18.000 genes homólogos con la especie humana. La información proporcionada por el Proyecto Genoma Canino, para deleite de los investigadores y de los propietarios de perros, ya ha ayudado a combatir la enfermedad degenerativa de la retina. Los investigadores de la Universidad de Pensilvania utilizaron la terapia génica para tratar la amaurosis congénita de Leber (CLA), una enfermedad parecida a la PRA. Inyectando copias de genes normales en la retina de un cachorro con ceguera congénita, los investigadores pudieron restaurar parcialmente la visión del perro. Esta es la primera vez que se invirtió una ceguera congénita en un animal mayor que un ratón, dando esperanzas de que la investigación para el tratamiento de la PRA no es en vano.

El Proyecto Genoma Canino puede ser beneficioso para la especie humana más allá de la reducción de las enfermedades de su compañero canino. Esto se debe a que el 85 por ciento de los genes del genoma canino tiene equivalentes en la especie humana, y cerca de 300 enfermedades que afectan a los perros también afectan a los humanos. De hecho, las diez enfermedades más corrientes en los perros de raza son también los principales problemas de la salud humana, como enfermedades cardíacas, epilepsia, alergias y cáncer. La identificación de un gen responsable de una enfermedad en los perros puede ser el camino más corto para aislar el gen correspondiente en humanos. Por ejemplo, el gen responsable de una forma corriente de PRA en los perros (*prcd*) parece que es la versión canina del gen que da lugar a la retinitis pigmentosa (RP) en humanos, que aflige a cerca de 1,5 millones de personas en todo el mundo. A pesar de la mucha investigación, se conoce poco la RP y los tratamientos normales sólo hacen más lento su progreso. La comprensión de las bases genéticas de la PRA podría dar lugar a progresos en el diagnóstico y tratamiento de la RP, potencialmente salvando la visión de miles de personas cada año. Contribuyendo a la curación de enfermedades humanas, los perros pueden probar que son «los mejores amigos del hombre» de un modo totalmente nuevo.

Referencias

Kirkness, E.F. et al. 2003. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 01:1898–1903.

Ray, K., Baldwin, V., Acland, G., and Aquirre, G. 1995. Molecular diagnostic tests for ascertain3ment of genotype at the rod cone dysplasia locus (*rcd1*) in Irish setters. *Curr. Eye Res*. 14:243.

Smith, C.A. 1994. New hope for overcoming canine inherited disease. *Am. J. Vet. Med. Assoc.* 204:41–46.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Desde que se redescubrió el trabajo de Mendel, el estudio de la genética de la transmisión se ha ampliado para incluir muchos modos alternativos de herencia. En muchos casos, los fenotipos pueden estar influidos por dos o más genes de varias maneras.
2. La dominancia incompleta, o parcial, se presenta cuando para un carácter aparece un fenotipo intermedio en un organismo que es heterozigoto para dos alelos.
3. La codominancia se manifiesta cuando en un organismo heterozigoto se expresan de manera característica los dos alelos.

4. El concepto de alelismo múltiple se aplica a poblaciones, ya que un organismo diploide puede llevar sólo dos alelos en un locus dado. Sin embargo, en una población pueden darse muchos alelos alternativos del mismo gen.
5. Las mutaciones letales dan lugar, normalmente, al deterioro, inactivación o a la ausencia de síntesis de productos génicos esenciales en el desarrollo. Tales mutaciones pueden ser recesivas o dominantes. Algunos genes letales, como el que ocasiona la enfermedad de Huntington, no se expresan hasta el estado adulto.
6. Los fenotipos están afectados a menudo por más de un gen, dando lugar a una variedad de modificaciones de las proporciones mendelianas dihíbridas y trihíbridas. Tales casos se clasifican a menudo bajo el encabezamiento de interacción génica.
7. Puede darse epistasia cuando dos o más genes influyen en un único carácter. Normalmente, la expresión de uno de estos genes enmascara la expresión del otro gen o genes.
8. Los genes localizados en el cromosoma X presentan un modo de herencia característico, denominado ligado al X. Las proporciones fenotípicas ligadas al X aparecen debido a que los individuos hemizigotos (aquellos con un cromosoma X y un cromosoma Y) expresan todos los alelos presentes en sus cromosomas X.
9. La herencia limitada por el sexo y la influenciada por el sexo se dan cuando el sexo del organismo afecta al fenotipo controlado por un gen localizado en un autosoma.
10. La expresión fenotípica no es siempre el reflejo directo del genotipo. La penetración mide el porcentaje de organismos de una población dada que manifiestan el correspondiente fenotipo mutante. Por otro lado, la expresividad mide el rango de la expresión fenotípica de un genotipo dado.
11. La expresión fenotípica puede quedar modificada por el fondo genético, la temperatura y la nutrición. Los efectos de posición ilustran la existencia de un fondo genético que afecta a la expresión fenotípica.
12. La anticipación genética se refiere a que el inicio de la expresión fenotípica ocurre más pronto y llega a ser más grave en cada una de las generaciones siguientes.
13. La impronta genómica es un proceso en el que una región del cromosoma paterno o materno queda modificada (marcada), afectando así a su expresión fenotípica. Por consiguiente, la expresión depende de qué padre contribuya con el alelo mutante.

IDEAS Y SOLUCIONES

Los problemas de genética alcanzan una mayor complejidad si implican a dos caracteres independientes, a alelos múltiples, dominancia incompleta o epistasia. Los tipos de problemas más difíciles son aquellos que afrentaron genéticos pioneros en el laboratorio o en estudios de campo. Tuvieron que determinar el modo de herencia trabajando a la inversa, desde la observación de la descendencia hasta los padres de genotipo desconocido.

1. Considere el problema de la herencia de la forma de la cresta en las gallinas, en donde se han observado como fenotipos diferentes crestas en nuez, en guisante, en roseta y sencilla. *¿Cómo se hereda la forma de la cresta, y cuáles son los genotipos de la generación P_1 de cada cruce?* Utilice los siguientes datos para contestar estas cuestiones.

Cruce 1:	sencilla × sencilla	⟶	todas sencillas
Cruce 2:	nuez × nuez	⟶	todas nuez
Cruce 3:	roseta × guisante	⟶	todas nuez
Cruce 4:	$F_1 \times F_1$ del Cruce 3		
	nuez × nuez	⟶	93 nuez
			28 roseta
			32 guisante
			10 sencillas

Solución: A primera vista, este problema puede parecer muy difícil. Sin embargo, como en otros problemas de dificultad parecida, aplicando un enfoque sistemático y realizando el análisis paso a paso, normalmente los resolveremos. El planteamiento implica dos pasos. Primero, analice cuidadosamente en los datos cualquier información útil. Una vez haya identificado algo que es claramente útil, siga el método empírico; es decir, formule una hipótesis y compruébela respecto de los datos dados. Busque un patrón de herencia que sea consistente con todos los casos.

Por ejemplo, este problema proporciona dos datos útiles de manera inmediata. Primero, en el Cruce 1, los individuos P_1 son raza pura. Segundo, mientras que las nuez de P_1 actúan como raza pura (cruce 2), el cruce entre roseta y guisante (cruce 3) también da lugar a fenotipo nuez. Cuando estas nuez de F_1 se cruzan (cruce 4) se producen los cuatro tipos de cresta, en una proporción que se aproxima a 9:3:3:1. Este hecho debería sugerirle de manera inmediata un cruce en el que están implicados dos pares de genes, debido a que los datos resultantes se parecen muchísimo a la proporción de un cruce dihíbrido mendeliano. Ya que se trata de un único carácter y se dan fenotipos discontinuos (la forma de la cresta), quizá se este dando algún tipo de epistasia. Esto puede servir como hipótesis de trabajo y ahora se tendrá que proponer cómo interaccionan los dos pares de genes para producir cada fenotipo.s.

Si llamamos a las pares de alelos *A*, *a* y *B*, *b*, podríamos predecir que, ya que nuez representa el 9/16 del cruce 4, *A-B*-dará lugar a nuez. Podríamos también suponer que en el caso del cruce 2, los genotipos fueran *AABB* × *AABB*, en donde nuez se comporta como raza pura. (Recuerde que *A-* y *B-* significan *AA* o *Aa* y *BB* o *Bb*, respectivamente.) Ya que la cresta sencilla es el fenotipo representado por 1/16 de los descendientes del cruce 4, podríamos predecir que este fenotipo es el resultado del genotipo aabb, lo que está de acuerdo con el cruce 1.

Ahora nos queda sólo por determinar los genotipos para roseta y guisante. Una suposición lógica sería que al menos un alelo dominante *A* o *B*, combinado con la homozigosis recesiva del otro par de alelos podría explicar estos fenotipos; es decir,

A–bb roseta
y
aa B– guisante

En el cruce 3, si se cruzara *Aabb* (roseta) con *aaBB* (guisante), todos los descendientes serían *AaBb* (nuez). Esto está de acuerdo

con los datos, y ahora debemos de mirar sólo al cruce 4. Predecimos que los genotipos para nuez son *AaBb* (como antes), y del cruce

AaBb (nuez) × *AaBb* (nuez)

esperamos

9/16 *A-B-* (nuez)
3/16 *A-bb* (roseta)
3/16 *aaB-* (guisante)
1/16 *aabb* (sencilla)

Nuestra predicción está de acuerdo con los datos. La hipótesis inicial de interacción epistática de dos pares de genes se ha probado consistente, y el problema se ha resuelto.

Este ejemplo demuestra la necesidad de conocer la base teórica de la genética de la transmisión. Luego, se pueden investigar los puntos adecuados para poder ir paso a paso hacia la solución. La resolución de problemas clave requiere práctica, pero proporciona mucha satisfacción. Aplique este planteamiento a los siguientes problemas.

2. En los rábanos, el color de la flor puede ser rojo, púrpura o blanco. La parte comestible del rábano puede ser larga u oval. Cuando se estudia solo el color de la flor, no hay evidencia de dominancia, y el cruce rojas × blancas dan lugar solo a púrpura. Si estas plantas púrpura F_1 se cruzan entre sí, la F_2 consta de 1/4 rojas: 1/2 púrpura: 1/4 blancas. En cuanto a la forma del rábano, largo es dominante sobre oval de un modo mendeliano normal.

(a) Determine los fenotipos de F_1 y F_2 de un cruce entre un rábano rojo y largo y otro blanco y oval, ambos raza pura. Inicialmente asegúrese de definir los símbolos para los genes.

Solución: Este es un cruce dihíbrido modificado, en donde el par de genes que controla el color presenta dominancia incompleta. La forma se controla de modo convencional. Primero, establezcamos los símbolos de los genes:

RR = rojo   *O–* = long
Rr = púrpura   *oo* = oval
rr = blanco

P_1: *RROO* × *rroo*
(rojo largo) (blanco oval)

F_1: todas *RrOo* (púrpura largo)

$F_1 \times F_1$: *RrOo* × *RrOo*

F_2:

1/4 *RR*	3/4 *O–*	3/16 *RR O–*	rojo largo
	1/4 *oo*	1/16 *RR oo*	rojo oval
2/4 *Rr*	3/4 *O–*	6/16 *Rr O–*	púrpura largo
	1/4 *oo*	2/16 *Rr oo*	púrpura oval
1/4 *rr*	3/4 *O–*	3/16 *rr O–*	blanco, largo
	1/4 *oo*	1/16 *rr oo*	blanco, oval

Advierta que para obtener los anteriores resultados de F_2, hemos utilizado el método de la bifurcación en línea. Primero, hemos considerado el resultado del cruce de los padres F_1 para los genes de color (*Rr* × *Rr*). Luego se considera el resultado para la forma (*Oo* × *Oo*).

(b) Una planta oval y roja se cruzó con una planta de genotipo y fenotipo desconocido, dando lugar a los siguientes descendientes:

103 rojo largo: 101 rojo oval
98 púrpura largo: 100 púrpura oval

Determine el genotipo y el fenotipo de la planta desconocida.

Solución: Ya que los dos caracteres se heredan independientemente, los consideraremos por separado. Los datos indican una proporción 1/4 : 1/4 : 1/4 : 1/4. Primero, consideremos el color:

P_1: rojo × ¿? (desconocida)
F_1: 204 rojo (1/2)
198 púrpura (1/2)

Debido a que la planta roja tiene que ser*RR*, la planta desconocida debe de tener un genotipo *Rr* para dar lugar a estos resultados. Por ello tiene que ser púrpura. Consideremos ahora la foma:

P_1: oval × ¿? (desconocida)
F_1: 201 larga (1/2)
201 oval (1/2)

Debido a que la planta oval tiene que ser *oo*, la planta desconocida tiene que tener el genotipo *Oo* para dar lugar a estos resultados. Por ello tiene que ser larga. La planta desconocida es por tanto

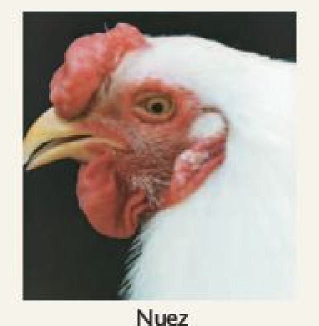
RrOo púrpura larga

3. En la especie humana, la ceguera para los colores rojo-verde se hereda como un carácter recesivo ligado al X. Una mujer con visión normal, cuyo padre era ciego para los colores, se casa con un varón con visión normal. Prediga la visión de los colores de sus descendientes masculinos y femeninos.

Solución: La mujer es heterozigota, ya que ha heredado un cromosoma X de su padre con el alelo mutante. Su marido es normal. Por consiguiente, los genotipos paternos son:

Cc × *C* ↾ (↾ representa al cromosoma Y)

Todos los descendienets femeninos son normales (*CC* o *Cc*). La mitad de los niños serán ciegos para los colores (*c* ↾), y la otra mitad tendrán visión normal (*C* ↾).


Nuez



Guisante


Roseta


Sencilla

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. En el ganado de cuerno corto, el color del pelaje puede ser rojo, blanco o ruano. Ruano es un fenotipo intermedio con una mezcla de pelos rojos y blancos. A partir de varios cruces se obtuvieron los siguientes datos:

rojos	×	rojo	⟶	todos rojos
blanco	×	blanco	⟶	todos blancos
rojo	×	blanco	⟶	todos ruanos
ruano	×	ruano	⟶	1/4 rojos:1/2 ruanos:1/4 blancos

   ¿Cómo se hereda el color del pelaje? ¿Cuáles son los genotipos de los padres y de sus descendientes en cada cruce?

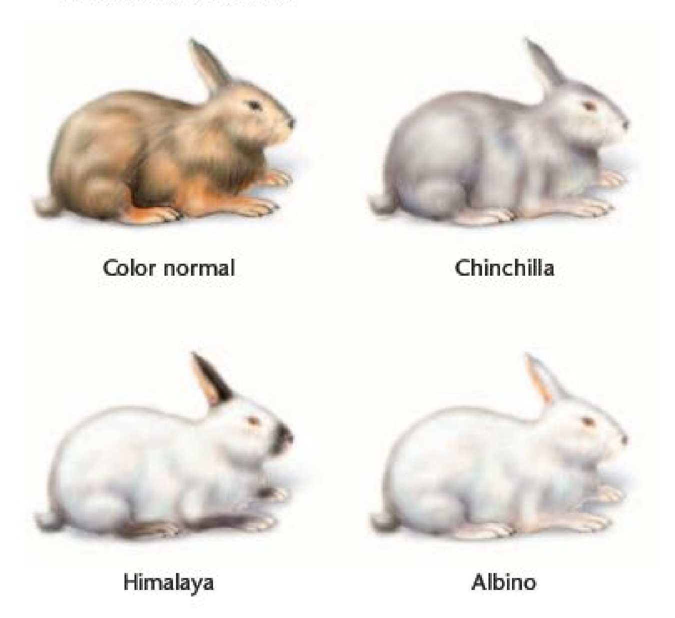
2. Compare dominancia incompleta y codominancia.
3. En los zorros, dos alelos de un gen, P y p, pueden dar lugar a letalidad (PP), pelaje platino (Pp) o pelaje plateado (pp). ¿Qué proporciones se obtendrán cuando se crucen zorros de pelaje platino? El alelo P, ¿se comporta como dominante o como recesivo respecto de la letalidad? ¿Y respecto del pelaje platino?
4. En los ratones se descubrió un mutante de cola corta. Cuando se cruzó con un ratón normal de cola larga, se obtuvieron 4 descendientes de cola corta y 3 de cola larga. Se seleccionaron dos ratones de cola corta de F_1 y se cruzaron. Dieron lugar a 6 ratones de cola corta y 3 ratones de cola larga. Estos experimentos genéticos se repitieron tres veces, aproximadamente con los mismos resultados. ¿De qué tipo de proporciones genéticas son ejemplo? Proponga una hipótesis sobre el modo de herencia y haga un esquema de los cruces.
5. Haga una lista de todos los posibles genotipos de los fenotipos A, B, AB y 0. El modo de herencia del grupo sanguíneo AB0, ¿es representativo de dominancia? ¿de recesividad? ¿de codominancia?
6. Con respecto al grupo sanguíneo AB0, determine los genotipos de la siguiente pareja :

   Varón: tipo sanguíneo B; madre tipo O
   Mujer: tipo sanguíneo A; padre tipo B

   Prediga los grupos sanguíneos de los descendientes que esta pareja puede tener y las proporciones esperadas de cada uno de ellos.
7. En un caso de disputa de paternidad, el niño es de tipo 0 mientras que la madre es de tipo A. ¿Qué tipo sanguíneo excluiría a un varón de ser el padre del niño? ¿Los otros grupos sanguíneos probarían que un varón concreto es el padre?
8. En la especie humana, los antígenos A y B se pueden encontrar, en su forma soluble en agua, en secreciones como la saliva, en algunos individuos (Se/Se y Se/se) pero no en otros (se/se). Las poblaciones tienen pues «secretores» y «no secretores».
   (a) Determine la proporción de los distintos fenotipos (tipo sanguíneo y secreción) en los cruces entre individuos que son del tipo sanguíneo AB y 0, y en el que ambos son Se/se.
   (b) ¿Cómo cambiarían los resultados de tales cruces si ambos padres fueran heterozigotos para el gen que controla la síntesis de la sustancia H (Hh)?
9. Indique que significa la frase «interacción génica», en lo que se refiere a la influencia de los genes sobre el fenotipo.
10. En los conejos, una serie de alelos múltiples controla el color del pelaje de la siguiente forma: C es dominante respecto de todos los otros alelos y da lugar a color normal. El fenotipo chinchilla se debe al alelo c^{ch}, que es dominante sobre todos los otros, excepto sobre el C. El alelo c^{h} sólo domina sobre el c^{a} (albino) y da lugar a un color de pelaje Himalaya. El orden de dominancia es $C > c^{ch} > c^{h} > c^{a}$. Para cada uno de los tres casos que se presentan a continuación, se muestran los fenotipos P_1 de los dos cruces, así como el fenotipo de un individuo de F_1.

	Fenotipos P_1		Fenotipos F_1
	Himalaya × Himalaya	⟶	albino
(a)			× ⟶ ??
	color normal × albino	⟶	chinchilla
	albino × chinchilla	⟶	albino
(b)			× ⟶ ??
	color normal × albino	⟶	color normal
	chinchilla × albino	⟶	Himalaya
(c)			× ⟶ ??
	color normal × albino	⟶	Himalaya

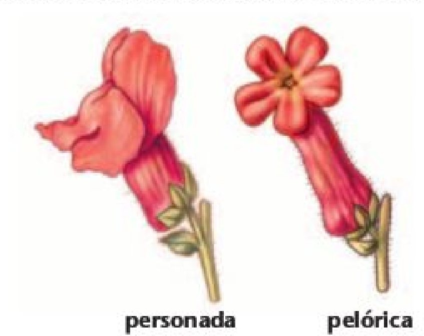
   En cada caso determine los genotipos de P_1 y F_1 y prediga los resultados que se obtendrían al cruzar dichos individuos F_1, tal como se muestra arriba.



11. En la cobaya, un locus que controla el color del pelaje, puede estar ocupado por cualquiera de los siguientes cuatro alelos: C (normal), c^{k} (sepia), c^{d} (crema), o c^{a} (albino). Como en el caso del color en los conejos (Problema 10), hay un orden de dominancia: $C > c^{k} > c^{d} > c^{a}$. En los siguientes cruces, diga los genotipos paternos y prediga las proporciones fenotípicas resultantes:
   (a) sepia × crema, en donde ambas cobayas tenían un padre albino.
   (b) sepia × crema, en donde la cobaya sepia tenía un padre albino y la cobaya crema tenía los dos padres sepia.
   (c) sepia × crema, en donde la cobaya sepia tenía los dos padres con color normal y la cobaya crema tenía los dos padres sepia.

(d) sepia × crema, en donde la cobaya sepia tenía un padre con color normal y el otro padre albino y la cobaya crema tenía los dos padres con color normal.

12. Tres pares de genes, localizados en autosomas distintos, determinan el color y la forma de la flor así como al altura de la planta. El primer par presenta dominancia incompleta, en donde el color puede ser rojo, rosa (el heterozigoto) o blanco. El segundo par da lugar a la forma de la flor personada (dominante) o pelórica (recesiva), mientras que el tercer par da lugar a tallos altos, dominantes, o tallos enanos, recesivos. Plantas homozigotas rojas, personadas y altas se cruzan con plantas blancas, pelóricas y enanas. Determine el genotipo y el fenotipo de F_1. Si las plantas F_1 se cruzan entre si, ¿qué proporción de descendientes manifestarán los mismos fenotipos que las plantas F_1?

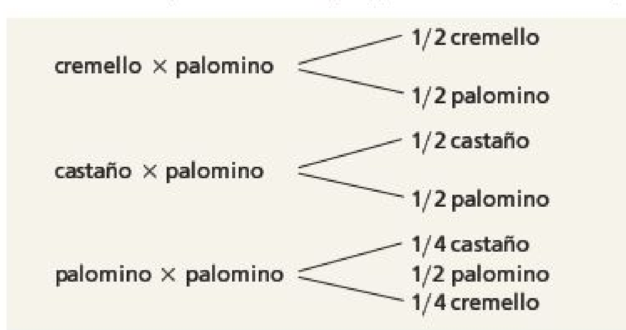


13. Como en el problema 12, el color puede ser rojo, blanco o rosa, y la forma personada o pelórica. En los siguientes cruces determine los genotipos de P_1 y F_1.

(a) roja pelórica × blanca personada	F1:	todas rosas personadas
(b) roja personada × blanca pelórica	F1:	todas rosas personadas
(c) rosa personada × roja pelórica	F1:	1/4 roja pelórica 1/4 roja personada 1/4 rosa pelórica 1/4 rosa personada
(d) rosa personada × blanca pelórica	F1:	1/4 blanca personada 1/4 blanca pelórica 1/4 rosa personada 1/4 rosa pelórica

¿Qué proporciones fenotípicas aparecerían en el cruce entre la F_1 de (a) y la F_1 de (b)?

14. Los caballos pueden ser cremello (un color crema claro) castaño (un color avellana), o palomino (un color dorado con la cola y la crin blancas). De estos fenotipos, palomino nunca es raza pura.









(a) De los resultados que se presentan en las columnas anteriores, determine el modo de herencia, asignando símbolos génicos e indicando qué genotipos producen qué fenotipos.

(b) Prediga los resultados de F_1 y F_2 de muchos cruzamientos entre caballos cremello y castaño.

15. En relación con los fenotipos del color del ojo que producen los loci recesivos, autosómicos y no ligados *brown* y *scarlet* en *Drosophila* (véase la Figura 4.10), prediga los resultados de F_1 y F_2 de los siguientes cruces P_1. (Recuerde que cuando ambos alelos, *brown* y *scarlet*, están en homozigosis, no se produce pigmento y el ojo es blanco.)

(a) tipo silvestre × blanco
(b) tipo silvestre × escarlata
(c) marrón × blanco

16. El pigmento del pelaje en los ratones se produce sólo cuando está presente el alelo *C*. Los individuos con genotipo *cc* son blancos. Si hay color, este se puede determinar por lo alelos *A*, *a*. *AA* o *Aa* dan lugar a un color agutí, mientras que *aa* da lugar a pelaje negro.

(a) ¿Qué proporciones fenotípicas y genotípicas se obtienen en F_1 y F_2 cuando se cruzan ratones *AACC* y *aacc*?

(b) En tres cruces entre hembras agutí, de genotipo desconocido, y machos de genotipo *aacc*, se obtuvieron las siguientes proporciones fenotípicas:

(1) 8 agutí 8 blanco	(2) 9 agutí 10 negros	(3) 4 agutí 5 negros 10 blancos

¿Cuáles son los genotipos de estas hembras?

17. En algunas plantas la cianidina, un pigmento rojo, se sintetiza a partir de un precursor incoloro. La adición de un grupo hidroxilo (OH^-) a la cianidina da lugar a un pigmento púrpura. En un cruce entre dos plantas púrpura, escogidas al azar, se obtuvieron los siguientes resultados:

94 púrpura
31 rojas
43 blancas

¿Cuántos genes están implicados en la determinación del color de estas flores? ¿Qué combinaciones genotípicas producen qué fenotipos? Esquematice el cruce púrpura × púrpura.

18. En las ratas, los siguientes genotipos de dos genes autosómicos independientes determinan el color del pelaje:

A–B–	(gris)
A–bb	(amarillo)
aaB–	(negro)
aabb	(crema)

Un tercer par génico, que se encuentra en un autosoma distinto, determina si se va a producir o no el color. Los genotipos *CC* y *Cc* permiten color de acuerdo con la expresión de los alelos *A* y *B*. Sin embargo los genotipos *cc* dan lugar a ratas albinas, independientemente de la presencia de los alelos *A* y *B*. Determine la proporción fenotípica de F_1 de los siguientes cruces:

(a)	*AAbbCC*	×	*aaBBcc*
(b)	*AaBBCC*	×	*AABbcc*
(c)	*AaBbCc*	×	*AaBbcc*
(d)	*AaBBCc*	×	*AaBBCc*
(e)	*AABbCc*	×	*AABbcc*

19. Dado el patrón de herencia del color del pelaje en las ratas, como se describe en el Problema 18, prediga los genotipos y los fenotipos de los padres que dan lugar a la siguiente descendencia:

(a) 9/16 gris:3/16 amarillo:3/16 negro:1/16 crema
(b) 9/16 gris:3/16 amarillo:4/16 albino
(c) 27/64 gris:16/64 albino:9/64 amarillo:9/64 negro: 3/64 crema
(d) 3/8 negro:3/8 crema:2/8 albino
(e) 3/8 negro:4/8 albino:1/8 crema

20. En una especie de la familia felina, el color del ojo puede ser gris, azul, verde o marrón y cada carácter se comporta como raza pura. En distintos cruces entre padres homozigotos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cruce	P_1	F_1	F_2
A	verde × gris	todos verdes	3/4 verde:1/4 gris
B	verde × marrón	todos verdes	3/4 verde:1/4 marrón
C	gris × marrón	todos verdes	9/16 verde:3/16 marrón 3/16 gris:1/16 azul

(a) Analice los datos: ¿Cuántos genes están implicados? Defina los símbolos génicos e indique qué genotipos producen cada fenotipo.
(b) En un cruce entre un felino de ojos grises y otro de genotipo y fenotipo desconocidos, no se observó la generación F_1. Sin embargo los resultados de la F_2 dieron lo mismo que la proporción F_2 del cruce C. Determine los genotipos y los fenotipos de los felinos P_1 y F_1.

21. En una planta, una variedad alta se cruza con una variedad enana. Todas las plantas F_1 fueron altas. Cuando se cruzaron plantas $F_1 \times F_1$ en la F_2 los 9/16 fueron altas y 7/16 enanas.
(a) Explique la herencia de la altura, indicando el número de pares de genes implicados y designando qué genotipos dan lugar a alto y cuales a enano (utilice guiones en donde sea apropiado).
(b) Si se autofecundan plantas F_2, ¿qué proporción será raza pura? Indique los genotipos.

22. En una especie vegetal, las flores pueden ser amarillas, azules, rojas o malva. Todos los colores pueden ser raza pura. Si plantas con flores azules se cruzan con plantas de flores rojas, todas las plantas F_1 tienen flores amarillas. Cuando se sigue hasta una F_2, se obtienen los siguientes resultados:

9/16 amarillas:3/16 azules:3/16 rojas:1/16 malvas

En otro cruce, usando como padres plantas de raza pura, se cruzaron plantas de flores amarillas con plantas de flores malva. De nuevo, todas las plantas F_1 tenían flores amarillas y en la F_2 apareció una proporción 9:3:3:1 como la anterior.
(a) Describa la herencia del color de la flor, definiendo los símbolos de los genes y designando qué genotipos dan lugar a cada uno de los cuatro fenotipos.
(b) Determine los resultados de F_1 y F_2 de un cruce entre plantas de raza pura con flores rojas y con flores malva.

23. En la Tabla siguiente se muestran cinco cruces en la especie humana (1-5), incluyendo los fenotipos maternos y paternos para los antígenos de los grupos sanguíneos AB0 y MN.

Fenotipos paternos	Descendientes
(1) A, M × A, N	(a) A, N
(2) B, M × B, M	(b) O, N
(3) O, N × B, N	(c) O, MN
(4) AB, M × O, N	(d) B, M
(5) AB, MN × AB, MN	(e) B, MN

Cada uno de los cruces da lugar a uno de los cinco grupos de descendientes que se presentan en la columna derecha (a-e). Conecte a los descendientes con los padres correctos, utilizando cada pareja de padres sólo una vez. ¿Hay más de un grupo de respuestas correctas?

24. Un matrimonio tiene visión normal, aunque el padre de cada cónyuge tiene ceguera para el rojo y el verde, que se hereda como recesivo ligado al X. ¿Cuál es la probabilidad de que su primer hijo sea, (a) un niño normal, (b) una niña normal, (c) un niño ciego para los colores, (d) una niña ciega para los colores?

25. En la especie humana el grupo sanguíneo AB0 se encuentra bajo el control de alelos múltiples autosómicos. La ceguera para los colores es un carácter recesivo ligado al X. Si dos padres, ambos de tipo A y con visión normal, tienen un hijo de tipo 0 y ciego para los colores, ¿cuál es la probabilidad de que su siguiente hijo sea una niña con visión normal y tipo 0?

26. En *Drosophila*, la mutación recesiva ligada al X, *scalloped* (*sd*) da lugar a que los márgenes del ala sean irregulares. Haga un esquema de los resultados en F_1 y en F_2 si (a) se cruza una hembra *scalloped* con un macho normal; (b) un macho *scalloped* con una hembra normal. Compare estos resultados con los que se obtendrían si *scalloped* no estuviera ligado al X.

27. Otra mutación recesiva de *Drosophila*, *ebony* (*e*), se encuentra en un autosoma (en el cromosoma 3) y da lugar a un cuerpo más oscuro que las moscas de tipo silvestre. ¿Qué proporciones fenotípicas en F_1 y F_2 de hembras y machos se obtendrán si se cruza una hembra con alas *scalloped*, con cuerpo de color normal, con un macho *ebony* de alas normales? Resuelva este problema tanto por el método del tablero de Punnett como por el método de la bifurcación en línea.

28. En *Drosophila*, la mutación recesiva ligado al X *vermilion* (*v*) da lugar a ojos rojo brillante, en contraste con los ojos rojo

ladrillo del tipo silvestre. Una mutación distinta recesiva autosómica, *suppressor of vermilion* (*su-v*), da lugar a que moscas homozigotas o hemizigotas para *v* tengan ojos de tipos silvestre. En ausencia del alelo *vermilion*, *su-v* no tiene ningún efecto sobre el color del ojo. Determine las proporciones fenotípicas en F_1 y en F_2 de cruces entre hembras con alelos de tipo silvestre en el locus *vermilion*, pero homozigotas para *su-v*, con un macho *vermilion* que tiene los alelos silvestres en el locus *su-v*.

29. Mientras que *vermilion* es un color de ojos rojo brillante ligado al X, *brown* es una mutación recesiva autosómica que oscurece el color del ojo. Las moscas que llevan las dos mutaciones pierden todo el pigmento y tienen los ojos blancos. Prediga los resultados en F_1 y F_2 de los siguientes cruces:

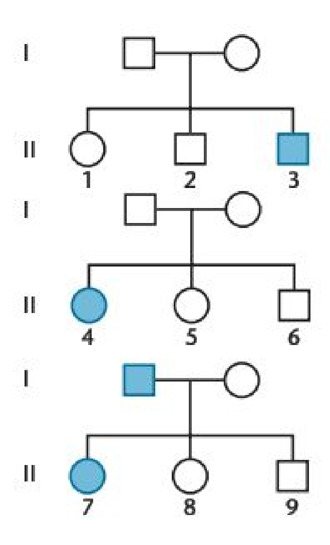
(a) Hembras *vermilion* × machos *brown*
(b) Hembras *brown* × machos *vermilion*
(c) Hembras blancas × machos de tipo silvestre

30. En un cruce de *Drosophila*, en el que están implicadas la mutación recesiva ligada al X *white* y una mutación recesiva autosómica *sepia* (que da lugar al oscurecimiento del ojo), prediga los resultados en F_1 y en F_2 al cruzar padres de raza pura con los siguientes fenotipos:

(a) hembras blancas × machos sepia;
(b) hembras sepia × machos blancos.

Advierta que *white* es epistático sobre la expresión de sepia.

31. Considere las tres genealogías siguientes, para un carácter en la especie humana:



(a) ¿Qué condiciones se pueden excluir¿

Condiciones: dominante y ligado al X
dominante y autosómico
recesivo y ligado al X
recesivo y autosómico

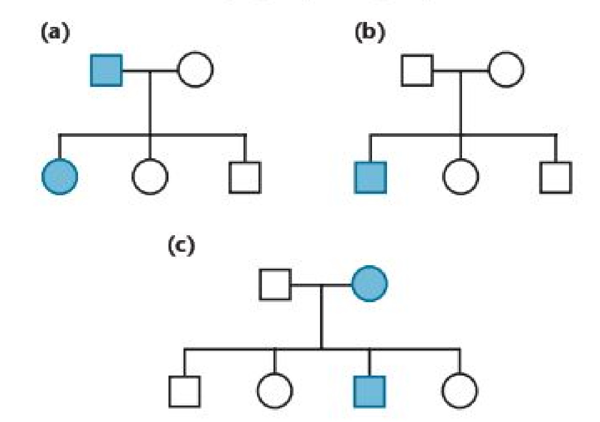
(b) En cualquiera de las condiciones que se excluyan, indique qué individuo de la generación II (p.e. II-1, II-2) le indujo a tomar la decisión de excluir dicha condición. Si ninguna fuera excluida, responda «no se aplica».

(c) Dadas sus conclusiones, indique el *genotipo* de los individuos siguientes:

II-1; II-6; II-9

Si hay más de una posibilidad, indíquelas. Utilice los símbolos *A* y *a* para los genotipos.

32. A continuación se dan tres genealogías. Considere en cada caso si es o no consistente con un carácter recesivo ligado al X. Con una frase o dos, indique por qué sí o por qué no



33. En el ganado vacuno con manchas, las regiones coloreadas pueden ser color caoba o rojo. Si una hembra roja y un macho caoba, que provienen ambos de líneas distintas de raza pura, se cruzan y el cruce se sigue hasta F_2, se obtienen los siguientes resultados:

F_1:	1/2 machos caoba
	1/2 hembras rojas
F_2:	3/8 machos caoba
	1/8 machos rojos
	3/8 hembras rojas
	1/8 hembras caoba

Cuando se realizó el recíproco del cruce inicial (hembras caoba con machos rojos), se obtuvieron idénticos resultados. Explique estos resultados proponiendo de qué manera está determinado genéticamente el color. Haga un esquema de los cruces.

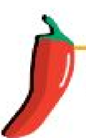
34. Prediga los resultados de F_1 y F_2, al cruzar un gallo con plumaje de gallo con una gallina de raza pura con plumaje de gallina. Recuerde que estos caracteres están limitados por el sexo.

35. Dos madres han dado a luz a sus hijos al mismo tiempo en un hospital urbano muy atareado. El hijo de la pareja 1 tiene hemofilia, una enfermedad ocasionada por un alelo recesivo ligado al X. Ninguno de los dos padres tiene la enfermedad. La pareja 2 tiene un hijo normal, a pesar de que el padre es hemofílico. Varios años más tarde la pareja 1 puso un pleito al hospital reclamando que estos dos recién nacidos se cambiaron después del nacimiento. Se le llama, como consejero genético, para testificar. ¿Qué información proporcionaría al jurado en relación con la alegación?

36. Discuta el tema de la expresión fenotípica y de los muchos factores que la afectan.

37. Compare la penetración y la expresividad como términos relacionados con la expresión fenotípica.

38. Compare el fenómeno de la anticipación genética y el de la impronta genómica.



Problemas extra-picantes

39. Los labradores perdigueros pueden ser negros, marrones (chocolate) o dorados (amarillos). Aunque cada color puede ser raza pura, se dan resultados muy diferentes si se examinan muchas camadas de una serie de cruces, en donde los padres no son necesariamente de raza pura. A continuación se presentan algunas de las muchas posibilidades.

(a) negro	×	marrón	⟶	todos negros
(b) negro	×	marrón	⟶	1/2 negros 1/2 marrones
(c) negro	×	marrón	⟶	3/4 negros 1/4 dorados
(d) negro	×	dorado	⟶	todos negros
(e) negro	×	dorado	⟶	4/8 dorados 3/8 negros 1/8 marrones
(f) negro	×	dorado	⟶	2/4 dorados 1/4 negros 1/4 marrones
(g) marrón	×	marrón	⟶	3/4 marrones 1/4 dorados
(h) negro	×	negro	⟶	9/16 negros 4/16 dorados 3/16 marrones

Proponga un modo de herencia que sea consistente con estos datos e indique los correspondientes genotipos de los padres de cada cruce. Indique también los genotipos de los perros que son de raza pura para cada color.



40. Se cruzó una planta de hojas púrpura, de raza pura, aislada de una zona del bosque tropical en Puerto Rico (El Yunque) con una variedad de hojas blancas, de raza pura, de una zona opuesta del bosque tropical. Los descendientes F_1 tenían todos hojas púrpura. Un gran número de cruces dio lugar a los siguientes resultados:

púrpura: 4.219; blancas: 5.781 (Total = 10.000)

Proponga una explicación de la herencia del color de la hoja. Como genético, ¿cómo podría comprobar su hipótesis? Describa los experimentos que realizaría.

41. En el ganado Dexter y Kerry, los animales pueden ser mochos (sin cuernos) o con cuernos. Los animales Dexter tienen patas cortas, mientras que los animales Kerry tienen patas largas. Cuando se obtienen muchos descendientes de cruces entre Kerry mochos y Dexter con cuernos, la mitad fueron Dexter mochos y la otra mitad Kerry con cuernos. Cuando se cruzaron los individuos de F_1, se obtuvieron los siguientes datos:

3/8 mochos Dexter
3/8 mochos Kerry
1/8 con cuernos Dexter
1/8 con cuernos Kerry

Un genético se extrañó de estos datos y entrevistó a los granjeros que habían criado este ganado durante décadas. Supo que las Kerry eran raza pura. Por otro lado, las Dexter no eran raza pura y nunca producían tantos descendientes como las Kerrys. Proponga una explicación genética de estas observaciones.



Vaca Kerry



Toro Dexter

42. Un genético extraterrestre, de un planeta en donde la investigación genética estaba prohibida, trajo consigo a la Tierra dos líneas de razas puras de ranas domésticas. Una línea croaba emitiendo un sonido *rib-it rib-it*, y tenían los ojos púrpura. La otra línea croaba más suavemente, murmurando *ni-dip ni-dip*, y tenían los ojos verdes. Con la nueva libertad recuperada para investigar, cruzó los dos tipos de ranas. En F_1 todas las ranas tenían los ojos azules y croaban *rib-it rib-it*. Continuó haciendo muchos cruces $F_1 \times F_1$ y cuando analizó completamente los datos de F_2 se dio cuenta que podían reducirse a las siguientes proporciones:

27/64	con ojos azules y croar *rib-it*
12/64	con ojos verdes y croar *rib-it*
9/64	con ojos azules y murmullo *ni-dip*
9/64	con ojos púrpura y croar *rib-it*
4/64	con ojos verdes y murmullo *ni-dip*
3/64	con ojos púrpura y murmullo *ni-dip*

(a) ¿Cuántos pares de genes están implicados en la herencia de ambos caracteres? Razone su respuesta.

(b) De estos, ¿cuántos controlan el color del ojo? ¿Cómo puede afirmarlo? ¿Cuántos controlan el croar?

(c) Asigne símbolos a todos los fenotipos e indique los genotipos de las ranas de P_1 y F_1.

(d) Indique los genotipos de los seis fenotipos de F_2.

(e) Después de años de experimentación, el genético aisló cepas de raza pura para los seis fenotipos de la F_2. Indique las proporciones fenotípicas de F_1 y F_2 de los siguientes cruces en los que se utilizan estas cepas de raza pura:
con ojos azules, murmullo *ni-dip* × con ojos púrpura, croar *rib-it*

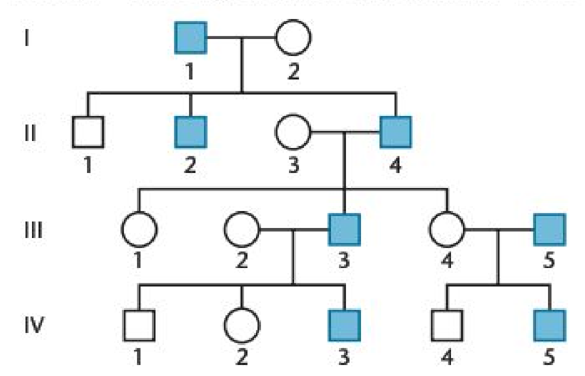
(f) Una serie de cruces con sus líneas de raza pura provocaron, inicialmente, cierta confusión al genético. Cuando cruzaba una raza pura con ojos púrpura y murmullo *ni-dip* con otra raza pura con ojos verdes y murmullo *ni-dip*, a menudo obtenía resultados distintos. En algunos cruces todos los descendientes tenían ojos azules y murmullo *ni-dip*, pero en otros cruces todos los descendientes tenían ojos púrpura y murmullo *ni-dip*. En un tercer tipo de cruces se observaron, 1/2 con ojos azules y murmullo *ni-dip* y 1/2 con ojos púrpura y murmullo *ni-dip*. Explicar por qué diferían los resultados.

(g) En otro experimento, el genético cruzó dos ranas con ojos púrpura y croar *rib-it*, con los resultados que se muestran a continuación

9/16 con ojos púrpura y croar *rib-it*
3/16 con ojos púrpura y murmullo *ni-dip*
3/16 con ojos verdes y croar *rib-it*
1/16 con ojos verdes y murmullo *ni-dip*

¿Cuáles eran los genotipos de los dos padres?

43. La siguiente genealogía es característica de un carácter heredable conocido como pubertad precoz del varón, en donde los varones afectados muestran signos de pubertad a la edad de 4 años.



Proponga una explicación genética de este fenotipo.

44. En las aves, el macho tienen dos cromosomas sexuales idénticos, denominados ZZ. La hembra tiene un cromosoma Z y otro cromosoma casi vació denominado W (las hembras son ZW). En el periquito, dos genes controlan el color de las plumas. La presencia del alelo dominante *Y* del primer gen da lugar a la producción de un pigmento amarillo. El alelo dominante *B* del segundo gen controla la producción de melanina. Cuando ambos genes son activos, el resultado es un pigmento verde. Si sólo es activo el gen *Y*, las plumas son amarillas. Si sólo es activo el gen *B* el color es azul. Si ninguno de los genes es activo, las aves son albinas. Por consiguiente, con nuestra nomenclatura convencional, los fenotipos se producen como sigue:

Y–B–	verde
Y–bb	amarillo
yyB–	azul
yybb	albino

(a) Una serie de cruces determinaron que uno de los genes es autosómico y el otro ligado al Z. Basándose en los resultados de los siguientes cruces, en donde ambos padres son raza pura, determine qué gen es el ligado al Z:

P_1:	macho verde × hembra albina
F_1:	1/2 machos verdes, 1/2 hembras albinas
F_2:	6/16 machos verdes
	2/16 machos amarillos
	3/16 hembras verdes
	1/16 hembras amarillas
	3/16 hembras azules
	1/16 hembras albinas

Apoye su respuesta determinando los genotipos de los padres P_1 y del cruce hasta la generación F_2.

(b) En un cruce en donde se desconocía los genotipos paternos, pero estos eran raza pura, se contabilizaron los descendientes de cruces repetidos, tal como se muestra aquí:

13	machos verdes
3	machos amarillos
11	hembras azules
5	hembras albinas

Basándose en estos resultados, determine los fenotipos y genotipos de los padres.



45. En un examen se preguntó la respuesta de la siguiente cuestión, que se refiere a convertir datos a unas «proporciones con sentido», y luego resolver el problema. El profesor supuso que la proporción final reflejaría dos pares de genes y dio la respuesta más correcta. Esta es la cuestión del examen.

«Las flores pueden ser blancas, naranjas o marrones. Cuando plantas de flores blancas se cruzan con plantas de flores marrones, toda la F_1 tenía flores blancas. Para las flores de F_2 se obtuvieron los siguientes datos:

48 blancas
12 naranjas
4 marrones

Convierta los datos de la F_2 en proporciones con sentido que le permita explicar la herencia del color. Determine el número de genes implicados y los genotipos responsables de cada fenotipo».

(a) Resuelva el problema para dos pares de genes. ¿Cuál es la proporción en la F_2?

(b) Ciertos estudiantes no acertaron a reducir la proporción y resolvieron el problema utilizando tres pares de genes. Cuando se examinó cuidadosamente, su solución se consideró como respuesta válida. Resuelva el problema utilizando tres pares de genes.

(c) Ahora tenemos un dilema. Los datos son consistentes con dos mecanismos de herencia alternativos. Proponga un experimento de cruce con los padres originales que le permitan distinguir entre las dos soluciones propuestas por los estudiantes. Explique de qué manera este experimento resolvería el dilema.

46. En el dondiego de noche, se observan flores de muchos colores. En un cruce entre dos cepas puras que eran carmesí y blanca, toda la F_1 era de color rosa. En la F_2 aparecieron cuatro nuevos fenotipos, junto con los colores paternos de P_1 y F_1. Se obtuvieron las siguientes proporciones:

1/16 carmesí	4/16 rosa
2/16 naranja	2/16 amarillo pálido
1/16 amarillo	4/16 blanca
2/16 magenta	

Proponga una explicación de la herencia de los colores de las flores de arriba.

47. Los protooncogenes estimulan a las células para progresar en el ciclo celular y comenzar la mitosis. En células que no se dividen, la transcripción de los protooncogenes es inhibida por moléculas reguladoras. Como es normal en todos los genes, los protooncogenes tienen en su DNA una región reguladora seguida de una región codificadora que especifica la secuencia de aminoácidos del producto génico. Considere dos tipos de mutación en un protooncogen, una en la región reguladora que elimina el control de la transcripción y la otra en la región codificadora que da lugar a un producto génico inactivo. Caracterice estos dos alelos mutantes como mutación con ganancia de función o mutación con pérdida de función e indique si serían dominantes o recesivos.

48. En la especie humana, la anemia falciforme presenta muchas características fenotípicas junto con las que afectan a lo glóbulos rojos que, con tensión baja de oxígeno, adquieren forma de hoz, forman coágulos y tienen una vida media más corta de lo normal, dando lugar a anemia. En conjunto, el fenotipo incluye episodios de fuertes dolores abdominales, debilidad y fatiga, alargamiento de los huesos largos, dilatación del corazón, fallos renales y dificultades respiratorias incluyendo neumonía. (a) ¿Qué término describe los casos de manifestaciones fenotípicas múltiples de un único gen? (b) Relacione cada una de estas respuestas fenotípicas a la falcemia y anemia. (c) Realice una búsqueda en la Red (o vaya al Capítulo 14) y determine las bases moleculares de la enfermedad.

LECTURAS SELECCIONADAS

Bartolomei, M.S., and Tilghman, S.M. 1997. Genomic imprinting in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31:493-525.

Brink, R.A., ed. 1967. *Heritage from Mendel.* Madison: University of Wisconsin Press.

Bultman, S.J., Michaud, E.J., and Woychik, R.P. 1992. Molecular characterization of the mouse *agouti* locus. *Cell* 71:1195-1204.

Carlson, E.A. 1987. *The gene: A critical history*, 2d ed. Philadelphia: Saunders.

Cattanach, B.M., and Jones, J. 1994. Genetic imprinting in the mouse: Implications for gene regulation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 17:403-20.

Feil, R., and Kelsey, G. 1997. Genomic imprinting: A chromatin connection. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1213-19.

Foster, H.L. et al., eds. 1981. The mouse in biomedical research, Vol. 1. *History, genetics, and wild mice.* Orlando, FL: Academic Press.

Grant, V. 1975. *Genetics of flowering plants.* New York: Columbia University Press.

Harper, P.S. et al. 1992. Anticipation in myotonic dystrophy: New light on an old problem. *Am. J. Hum. Genet.* 51:10-16.

Howeler, C.J. et al. 1989. Anticipation in myotonic dystrophy: Fact or fiction? *Brain* 112:779-97.

Morgan, T.H. 1910. Sex-limited inheritance in *Drosophila. Science* 32:120-22.

Nolte, D.J. 1959. The eye-pigmentary system of *Drosophila. Heredity* 13:233-41.

Pawelek, J.M., and Körner, A.M. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 70:136-45.

Peters, J.A., ed. 1959. *Classic papers in genetics.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Phillips, P.C. 1998. The language of gene interaction. *Genetics* 149:1167-71.

Race, R.R., and Sanger, R. 1975. *Blood groups in man*, 6th ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publishers.

Sapienza, C. 1990. Parental imprinting of genes. *Sci. Am.* (Oct.) 363:52-60.

Siracusa, L.D. 1994. The *agouti* gene: Turned on to yellow. *Cell* 10:423-28.

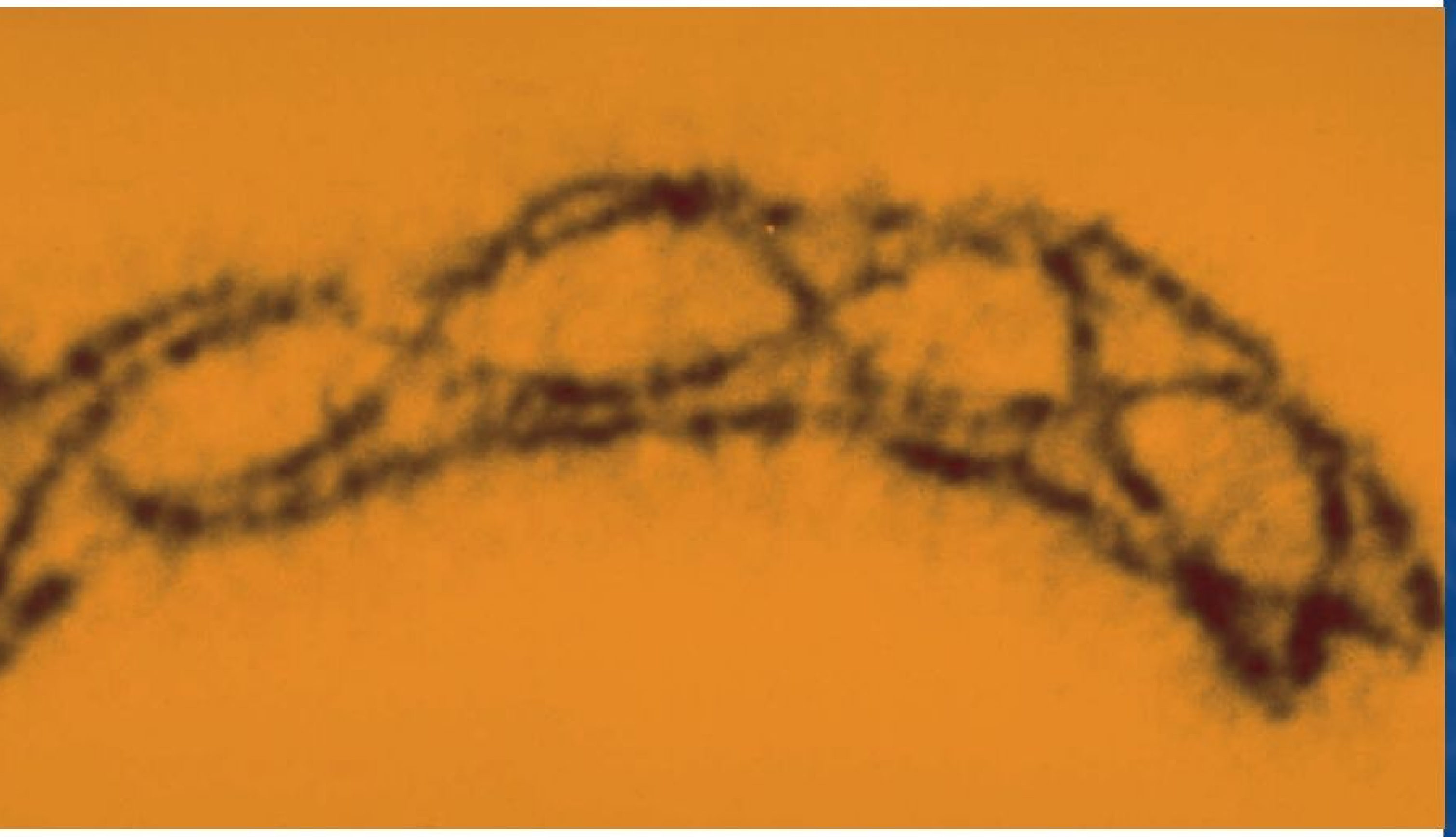
Voeller, B.R., ed. 1968. *The chromosome theory of inheritance—Classic papers in development and heredity.* New York: Appleton-Century-Crofts.

Watkins, M.W. 1966. Blood group substances. *Science* 152:172-81.

Yoshida, A. 1982. Biochemical genetics of the human blood group ABO system. *Am. J. Hum. Genet.* 34:1–14.

Ziegler, I. 1961. Genetic aspects of ommochrome and pterin pigments. *Adv. Genet.* 10:349-403.

Cartografía cromosómica en eucariotas



Quiasmas entre homólogos en sinapsis en la primera profase meiótica.

Conceptos del capítulo

- Los cromosomas de los eucariotas tienen muchos genes, localizados en posiciones fijas a lo largo de los cromosomas.
- A menos que se separen por entrecruzamiento, los alelos presentes en un homólogo se segregan como una unidad en la formación de los gametos.
- El entrecruzamiento en la meiosis entre homólogos da lugar a gametos recombinantes que incrementan la variación genética.
- El entrecruzamiento entre homólogos es la base para la construcción de mapas cromosómicos.
- Los mapas de cromosomas sirven para caracterizar ordenadamente los genes de un organismo..

Walter Sutton, junto con Theodor Boveri, fue el responsable de la unión de los campos de la citología y de la genética. Ya en 1903, Sutton señaló la posibilidad de que en la mayoría de los organismos hubiera muchos más «factores» que cromosomas. Muy poco después, las investigaciones genéticas en varios organismos revelaron que ciertos genes no se transmitían de acuerdo con la ley de la transmisión independiente; más bien, parecía que estos genes segregaban como si estuvieran de alguna manera ligados o unidos. Nuevas investigaciones demostraron que tales genes formaban parte del mismo cromosoma y que se transmitían realmente como una unidad.

Sabemos ahora que la mayoría de los cromosomas albergan un número muy grande de genes. Se dice que los genes que forman parte del mismo cromosoma están *ligados* y muestran **ligamiento** en los cruces.

Debido a que es el cromosoma, y no el gen, la unidad de transmisión en la meiosis, los genes ligados no son libres para transmitirse independientemente. Por el contrario, los alelos de todos los loci de un cromosoma se transmitirían en teoría como una unidad en la formación de los gametos. Sin embargo, en muchos casos no ocurre así. Como vimos en el Capítulo 2, en la primera profase meiótica, cuando los homólogos se aparean (o sufren sinapsis), puede tener lugar un intercambio recíproco de segmentos de cromosomas. Este fenómeno, que se llama **entrecruzamiento**, da lugar a una mezcla, o **recombinación,** de los alelos entre los homólogos.

El entrecruzamiento se contempla normalmente como un proceso de rotura y reunión física real que se produce en la meiosis. Se puede ver un ejemplo en la micrografía que abre este capítulo. El intercambio de fragmentos de cromosomas proporciona un enorme potencial de variación genética en los gametos formados por cualquier individuo. Este tipo de variación, en combinación con la que resulta de la transmisión independiente, asegura que todos los descendientes contendrán mezclas diversas de los alelos maternos y paternos.

El grado de entrecruzamiento entre dos loci cualesquiera de un cromosoma es proporcional a la distancia que los separa, denominada **distancia interlocus**. Así, el porcentaje de gametos recombinantes varía dependiendo de qué loci se esté considerando. Esta correlación sirve de base para la construcción de **mapas cromosómicos**, que indican la localización relativa de los genes en los cromosomas.

En este capítulo discutiremos el ligamiento, el entrecruzamiento y la construcción de mapas cromosómicos. Consideraremos también una serie de temas que tienen que ver con el intercambio de la información genética, concluyendo el capítulo con la más bien intrigante cuestión de por qué Mendel, que estudió siete genes, no encontró ligamiento. ¿O lo hizo?

5.1 Los genes ligados en el mismo cromosoma se segregan juntos

Para proporcionar una visión simplificada del tema principal de este capítulo, en la Figura 5.1 se ilustran y se contrastan las consecuencias de la meiosis en (a) la transmisión independiente, (b) en el ligamiento *sin* entrecruzamiento y (c) en el ligamiento *con* entrecruzamiento. En la Figura 5.1(a) se ilustran los resultados de la transmisión independiente de dos pares de cromosomas, teniendo cada uno de ellos un par de genes en heterozigosis. No se manifiesta ligamiento. Cuando se observa un gran número de meiosis, se forman cuatro gametos genéticamente diferentes en proporciones iguales. Cada uno tiene una combinación diferente de alelos de los dos genes.

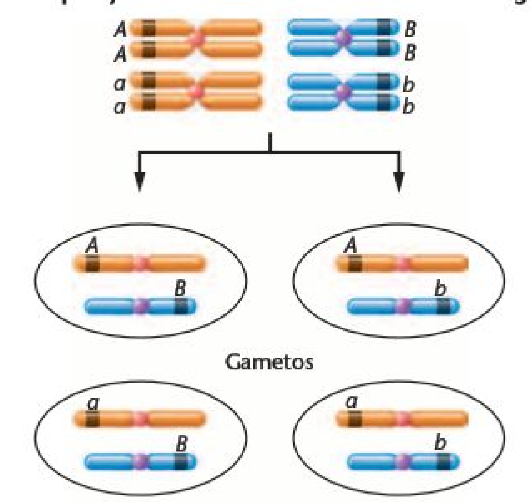
Podemos comparar estos resultados con los que se producen si estos mismos genes se encuentran ligados en el mismo cromosoma. Si no hay entrecruzamiento entre los dos genes [Figura 5.1(b)], sólo se formarán dos gametos genéticamente distintos. Cada gameto recibe los alelos presentes en uno o en el otro homólogo, que se han transmitido intactos como consecuencia de la segregación. Este caso ilustra el **ligamiento completo**, que da lugar a la producción de **sólo gametos paternos** o **no recombinantes**. Los dos gametos paternos se forman en proporción igual. Aunque el ligamiento completo entre dos genes ocurre raramente, es útil considerar las consecuencias teóricas de esta situación cuando se estudia el entrecruzamiento.

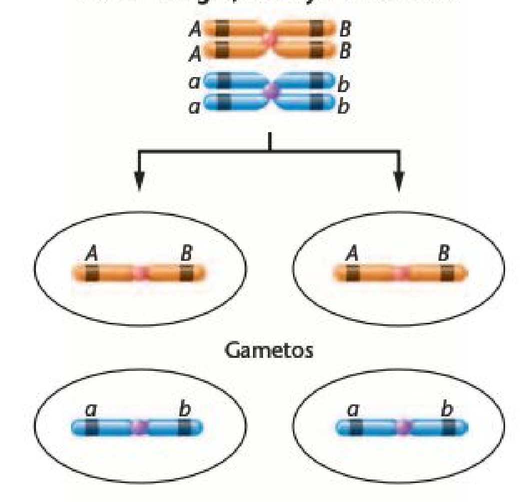
La Figura 5.1(c) ilustra el resultado cuando entre los dos genes ligados hay entrecruzamiento. Como se puede ver, este entrecruzamiento implica sólo a dos cromátidas no hermanas de las cuatro cromátidas presentes en la tétrada. Este intercambio da lugar a dos nuevas combinaciones alélicas, llamados **gametos recombinantes**. Las dos cromátidas no implicadas en el intercambio dan lugar a los gametos no recombinantes, como los de la Figura 5.1(b).

En general, la frecuencia con la que se da el entrecruzamiento entre dos genes ligados cualesquiera es proporcional a la distancia a la que se encuentran los respectivos loci en el cromosoma. En teoría, dos genes tomados al azar pueden estar tan próximos que no sean fácilmente detectables los raros entrecruzamientos entre ellos. Esta circunstancia, de ligamiento completo, da lugar a la producción de gametos sólo paternos, como se muestra en la Figura 5.1(b). Por otro lado, si los dos genes están separados por una corta distancia, se formarán pocos gametos recombinantes y muchos paternos. A medida que aumenta la distancia entre dos genes, aumenta la proporción de gametos recombinantes y disminuye la de gametos paternos.

Como discutiremos de nuevo más tarde en este capítulo, cuando los loci de dos genes ligados se encuentran muy alejados, el número de gametos recombinantes se aproxima, pero nunca excede, al 50 por ciento. Si hay un 50 por ciento de recombinantes, se producirán cuatro tipos en la proporción 1:1:1:1 (dos gametos paternos y dos recombinantes). En tal caso, la transmisión de dos genes ligados no se podría distinguir de la de dos genes no ligados, que se transmiten independientemente. Es decir, la proporción de los cuatro posibles genotipos será idéntica, como se muestra en la Figura 5.1(a) y (c).

Seminario Web 5.1
Ligamiento y recombinación





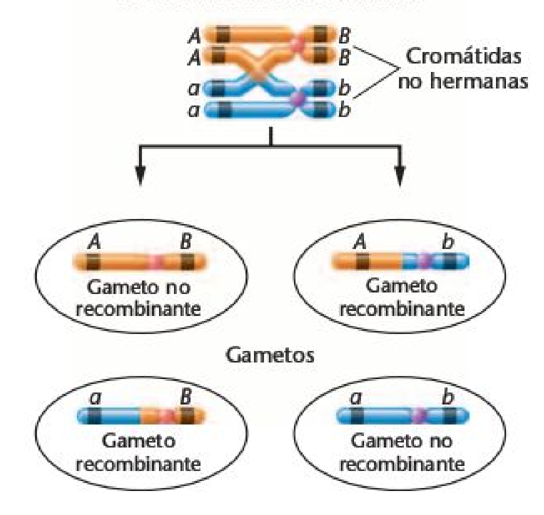


FIGURA 5.1 Resultados de la formación de gametos cuando dos genes en heterozigosis se encuentran (a) en dos parejas diferentes de cromosomas; (b) en el mismo par de homólogos, pero sin intercambio entre ellos; y (c) en el mismo par de homólogos, con intercambio entre dos cromátidas no hermanas.

Ahora resuelva esto

En el Problema 5.9 de la página 147 se le pide que compare los resultados de un cruce prueba cuando dos genes no están ligados y cuando lo están, si están muy alejados o relativamente próximos.

Sugerencia: Los resultados no se distinguen cuando dos genes no están ligados del caso en que están ligados pero tan alejados que en la meiosis siempre hay entrecruzamiento entre ellos.

La proporción de ligamiento

Si hay ligamiento completo entre dos genes, debido a su proximidad, y se cruzan organismos heterozigotos para ambos loci, aparece una proporción fenotípica única en F_2, que designaremos como la **proporción de ligamiento.** Para ilustrar esta proporción, consideremos un cruce entre dos genes mutantes recesivos íntimamente ligados, ojos *brown (bw)* (marrones) y venas alares *heavy (hv)* (gruesas) en *Drosophila melanogaster* (Figura 5.2). Los alelos normales de tipo silvestre, bw^+ y hv^+ son ambos dominantes y dan lugar a ojos rojos y venas alares finas, respectivamente.

En este cruce, se aparearon moscas con ojos mutantes marrones y venas alares finas con moscas de ojos rojos normales y venas alares gruesas. Para ser más concisos, podemos nombrar a estas moscas simplemente refiriéndonos a ellas por sus fenotipos mutantes y decir que se cruzan moscas de ojos marrones con moscas de venas alares gruesas. Utilizando los símbolos genéticos establecidos en el Capítulo 4, los genes ligados se pueden representar situando la notación de sus alelos por encima y por debajo de una línea, doble o sencilla, horizontal. Aquellos situados por encima de la línea son loci localizados en uno de los homólogos, y los situados debajo son los loci localizados en el otro homólogo. Así, podemos representar la generación P_1 como sigue:

$$P_1: \frac{bw\ hv^+}{bw\ hv^+} \times \frac{bw^+\ hv}{bw^+\ hv}$$

marrones, finas rojas, gruesas

Debido a que los genes están situados en un autosoma, y no en el cromosoma X, no es necesario distinguir a machos de hembras.

P_1

bw *hv*$^+$ / *bw* *hv*$^+$ × *bw*$^+$ *hv* / *bw*$^+$ *hv*

ojos marrones, venas finas

ojos rojos, venas gruesas

Formación de gametos

bw *hv*$^+$

bw$^+$ *hv*

Padre del cruce prueba

F_1

bw *hv*$^+$ / *bw*$^+$ *hv*

bw *hv* / *bw* *hv*

Debido al ligamiento completo, los individuos de F_1 forman sólo gametos paternos.

ojos rojos, venas finas

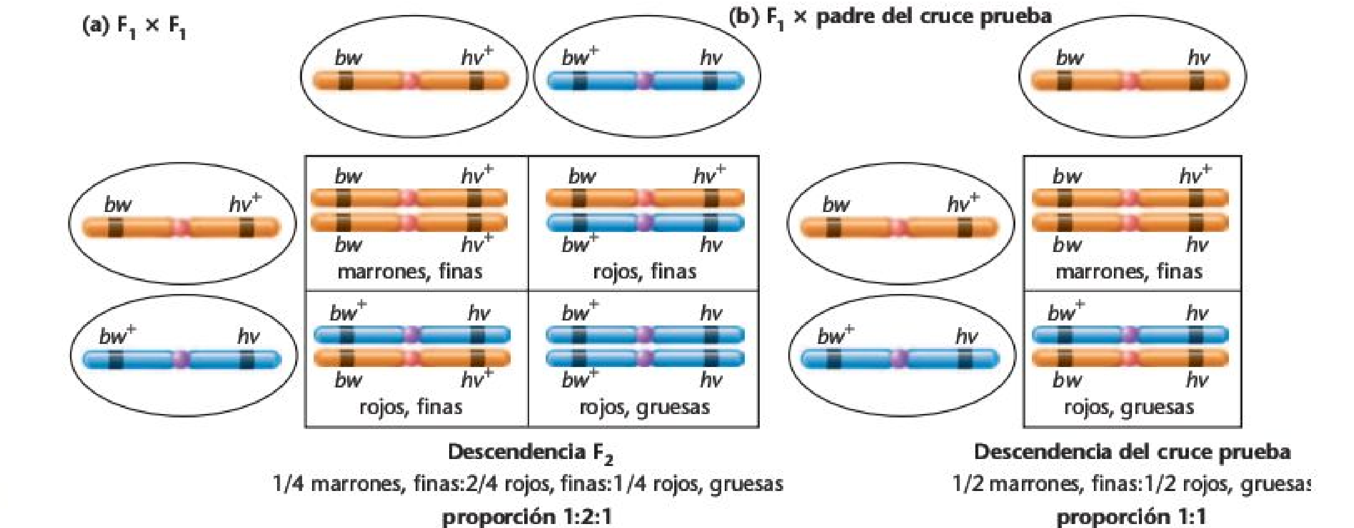
ojos marrones, venas gruesas

Formación de gametos

bw *hv*$^+$

bw$^+$ *hv*

bw *hv*



Seminario Web 5.2
Genes ligados y mapas

FIGURA 5.2 Resultado de un cruce entre dos genes localizados en el mismo cromosoma, en donde se demuestra ligamiento completo. (a) Los resultados del cruce. (b) Los resultados de un cruce prueba con los descendientes F_1.

En la generación F_1, cada mosca recibe un cromosoma de cada pareja de cada padre; todas las moscas son heterozigotas para ambos pares génicos y presentan los caracteres dominantes de ojos rojos y venas finas:

$$F_1: \frac{bw \quad hv^+}{bw^+ \; hv}$$

rojos, finas

Como se muestra en la Figura 5.2, debido al ligamiento completo, cuando la generación F_1 se cruza entre si, cada individuo de F_1 forma solo gametos paternos. Después de la fecundación, la generación F_2 dará lugar a una proporción genotípica y fenotípica de 1:2:1. La cuarta parte de las moscas de esta generación presentará ojos marrones y venas finas; la mitad presentará ambos caracteres normales, es decir, ojos rojos y venas finas; y una cuarta parte presentará ojos rojos y venas gruesas. más brevemente, la proporción es 1 marrones:2 silvestres:1 gruesas. Tal proporción es característica del ligamiento completo, que se observa sólo cuando los dos genes están muy íntimamente ligados y el número de descendientes es relativamente pequeño.

En la Figura 5.2 también se muestran los resultados de un cruce prueba con moscas F_1. Tal cruce da lugar a una proporción 1:1 de moscas marrones, delgadas y rojas, gruesas. Si estos genes que controlan estos caracteres tuvieran ligamiento incompleto o estuvieran localizados en autosomas distintos, el cruce prueba daría lugar a cuatro fenotipos en lugar de dos.

Cuando se investiga un gran número de genes mutantes presentes en cualquier especie, los genes localizados en el mismo cromosoma presentarán evidencias de ligamiento entre si. Por ello, se puede establecer un **grupo de ligamiento** para cada cromosoma. En teoría, el número de grupos de ligamiento tiene que corresponder con el número haploide de cromosomas. En organismos en donde se dispone de un gran número de genes mutantes para su estudio genético, esta correlación se cumple siempre.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo establecieron los primeros genéticos que muchos genes estaban ligados en un cromosoma y por ello se heredaban como una unidad, frente a su transmisión a través de los gametos de acuerdo con el principio mendeliano de la transmisión independiente?

5.2 El entrecruzamiento es la base para determinar la distancia entre genes en la construcción de mapas cromosómicos

Si se toman al azar dos genes ligados en el mismo cromosoma, es muy improbable que se encuentren tan íntimamente ligados uno del otro que muestren ligamiento completo. Por el contrario, en los cruces entre dos de tales genes, casi siempre se producirá un porcentaje de descendientes que provengan de gametos recombinados. Este porcentaje es variable y depende de la distancia que haya entre los dos genes. Este fenómeno fue explicado por primera vez en 1911 por dos genéticos de *Drosophila*, Thomas H. Morgan y su alumno Alfred H. Sturtevant.

Morgan y el entrecruzamiento

Como recordará de nuestra anterior discusión en el Capítulo 4, Morgan fue el primero en descubrir el fenómeno del ligamiento al X. En sus estudios investigó numerosas mutaciones de *Drosophila* localizadas en el cromosoma X. Cuando analizó cruces para un único carácter, pudo deducir el modo de herencia ligada al X. Sin embargo, cuando hizo cruces que implicaban simultáneamente a dos genes ligados al X, sus resultados fueron al principio desconcertantes. Por ejemplo, como se muestra en el cruce A de la Figura 5.3, cruzó hembras mutantes de cuerpo *yellow* (*y*)(amarillo) y de ojos *white* (*w*)(blancos) con machos de tipo silvestre (cuerpo gris y ojos rojos). Las hembras de F_1 eran de tipo silvestre, pero los machos expresaban ambos caracteres mutantes. En la F_2, el 98,7 por ciento de los descendientes presentaban los fenotipos paternos —moscas de cuerpo amarillo y ojos blancos y moscas de tipo silvestre (cuerpo gris y ojos rojos). El restante 1,3 por ciento de las moscas eran o bien de cuerpo amarillo y ojos rojos o de cuerpo gris y ojos blancos. Era como si los genes se hubieran separado de alguna manera en la formación de los gametos en las moscas F_1.

Cuando Morgan hizo cruces con otros genes ligados al X, los resultados fueron todavía más sorprendentes (cruce B de la Figura 5.3). Se observó el mismo patrón básico, pero las proporciones de los fenotipos F_2 diferían. Por ejemplo, en un cruce entre mutantes de ojos *white* y alas *miniature* (miniatura) con moscas de tipo silvestre, sólo el 62,8 por ciento de la F_2 presentaba los fenotipos paternos, mientras que el 37,2 por ciento de los descendientes aparecían como si los genes mutantes se hubieran separado en la formación de los gametos.

Como consecuencia de estas observaciones, Morgan se enfrentó a dos cuestiones: (1) ¿Cuál era la causa de la separación de los genes? Y (2) ¿Por qué la frecuencia de separación aparente variaba dependiendo de los genes estudiados? La respuesta dada a la primera cuestión se basó en su conocimiento de anteriores observaciones citológicas realizadas por F. A. Janssens y otros. Janssens había observado que los cromosomas homólogos en sinapsis en la meiosis en entrelazaban entre si, originando **quiasmas** en donde eran evidentes puntos de solapamiento. Morgan propuso que estos quiasmas podrían representar puntos de intercambio genético.

En los cruces que se presentan en la Figura 5.3, Morgan postuló que si ocurría un intercambio entre los genes mutantes situados en los dos cromosomas de las hembras de F_1, se obtendrían los resultados observados. Sugirió que tal intercambio daría lugar a un 1,3 por ciento de gametos recombi-

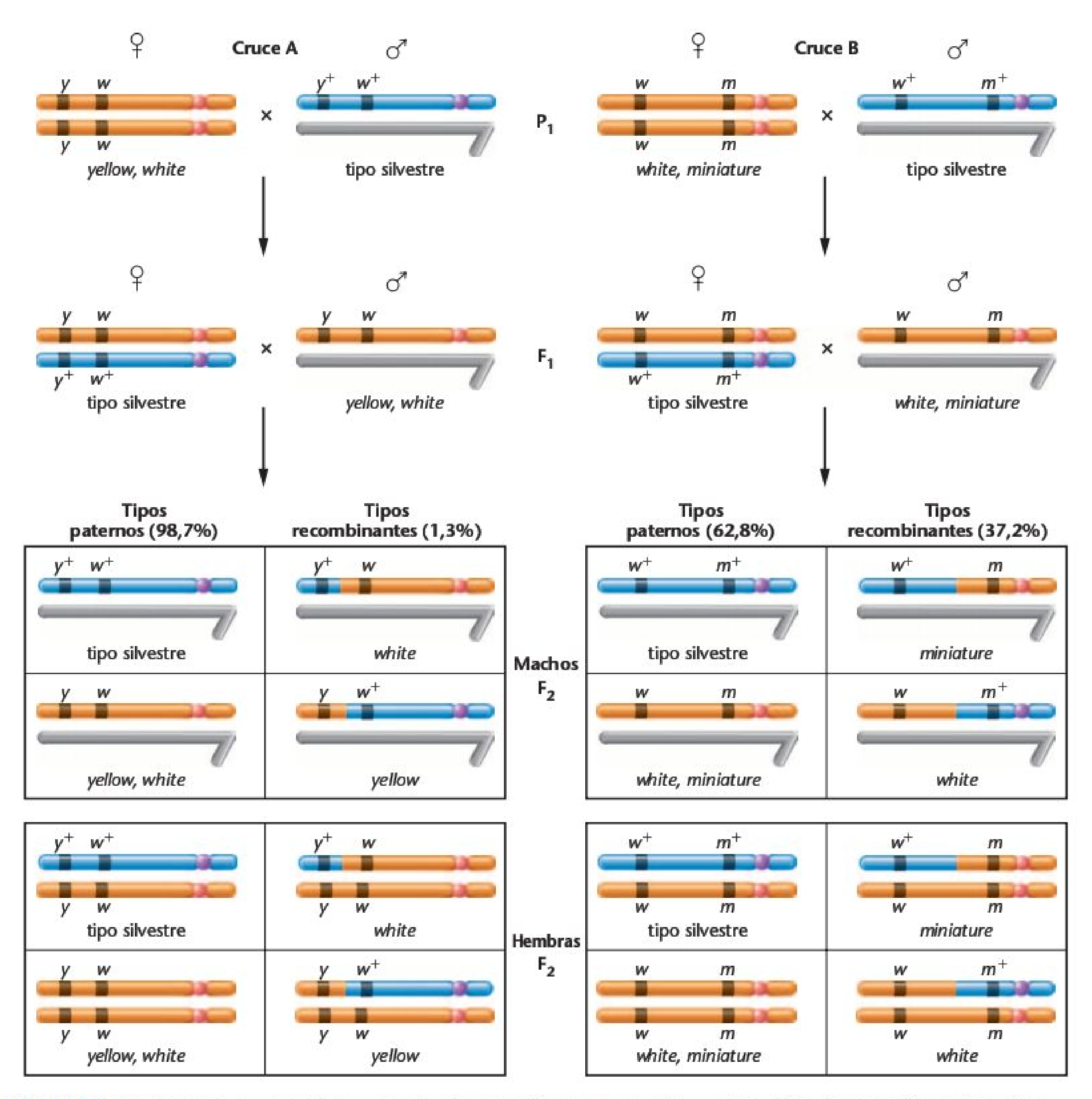


FIGURA 5.3 Resultados de F_1 y F_2 de los cruces entre las mutaciones cuerpo *yellow* y ojos *white* y las mutaciones ojos *white* y alas *miniature*. En el cruce A, el 1,3 por ciento de las moscas F_2 (machos y hembras) presentan fenotipos recombinantes, que manifiestan *white* o yellow. En el cruce B, el 37,2 por ciento de las moscas de F_2 (machos y hembras) presentan fenotipos recombinantes, que son *miniature* o *white*.

nantes en el cruce *yellow-white* y a un 37,2 por ciento en el cruce *white-miniature*. De acuerdo con esto y con otros experimentos, Morgan concluyó que si existen genes ligados en un orden lineal a lo largo del cromosoma, entonces entre cualesquiera dos genes habrá un porcentaje variable de intercambio.

Como respuestas a la segunda cuestión, Morgan propuso que es menos probable que entre dos genes localizados relativamente cerca uno del otro se forme un quiasma entre ellos que si los dos genes se encuentran alejados en el cromosoma. Por consiguiente, cuanto más próximos estén dos genes, menos probable es que ocurra entre ellos un intercambio. Morgan propuso el término **entrecruzamiento** para describir el intercambio físico que da lugar a la recombinación.

Sturtevant y la obtención de mapas

Alfred H. Sturtevant, alumno de Morgan, fue el primero en darse cuenta de que la propuesta de su maestro podía también utilizarse para cartografiar la secuencia de genes ligados. De acuerdo con Sturtevant,

> «En una conversación con Morgan ... me di cuenta súbitamente de que la variación en la fuerza del ligamiento, atribuida ya por Morgan a diferencias en la separación espacial de los genes, ofrecía la posibilidad de determinar secuencias en la dimensión lineal de un cromosoma. Fui a casa y emplee gran parte de la noche (descuidando mi trabajo casero de estudiante) en obtener el primer mapa cromosómico.»

Por ejemplo, Sturtevant compiló datos sobre la recombinación entre los genes mutantes *yellow*, *white* y *miniature*, estudiados inicialmente por Morgan, y observó las siguientes frecuencias de entrecruzamiento entre cada par de estos tres genes:

(1) *yellow*, *white*	0,5 por ciento
(2) *white*, *miniature*	34,5 por ciento
(3) *yellow*, *miniature*	35,4 por ciento

Debido a que la suma de (1) y (2) es aproximadamente igual a (3), Sturtevant argumentó que las frecuencias de recombinación entre genes ligados son aditivas. De acuerdo con esto, predijo que el orden de los genes en el cromosoma X era *yellow-white-miniature*. Al llegar a esta conclusión razonó lo siguiente: Los genes *yellow* y *white* se encuentran aparentemente próximos porque su frecuencia de recombinación es baja. Sin embargo, estos dos genes se encuentran muy alejados de *miniature* debido a que las combinaciones *white, miniature* y *yellow, miniature* muestran frecuencias de recombinación altas. Debido a que *miniature* muestra más frecuencia de recombinación con *yellow* que con *white* (35,4 respecto de 34,5 por ciento), se deduce que *white* se encuentra entre los otros dos genes, no fuera de ellos.

Sturtevant sabía por el trabajo de Morgan que la frecuencia de intercambio podía tomarse como una estimación de la distancia relativa entre dos genes o loci a lo largo del cromosoma. Construyó un mapa para los tres genes del cromosoma X, siendo la unidad de mapa igual al 1 por ciento de recombinación entre dos genes[1]. En el ejemplo anterior, la distancia entre *yellow* y *white* sería de 0,5 unidades de mapa (um) y entre *yellow* y *miniature* de 35,4 um. Se deduce que la distancia entre *yellow* y *miniature* debería ser (35,4 – 0,5) o 34,9 um. Esta estima es muy próxima a la frecuencia real de recombinación entre *white* y *miniature* (34,5 um). El mapa para estos tres genes se muestra en la Figura 5.4. Es importante recordar que

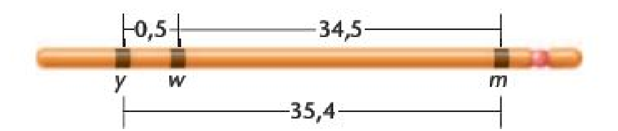


FIGURA 5.4 Mapa de los genes del cromosoma X de *Drosophila melanogaster yellow* (*y*), *white* (*w*), y *miniature* (*m*). Cada número indica el porcentaje de descendientes recombinantes que se producen en los tres cruces, implicando cada uno a dos genes distintos.

las unidades de mapa, como las mostradas, representan una medida de distancia *relativa*.

Además de estos tres genes, Sturtevant consideró otros dos genes del cromosoma X y obtuvo un mapa más amplio que incluía a los cinco genes. Muy poco después, él y su colega Calvin Bridges, comenzaron a investigar el ligamiento autosómico en *Drosophila*. En 1923 habían demostrado claramente que el ligamiento y el entrecruzamiento no estaban restringidos a los genes ligados al X, y pudieron también demostrarlo en autosomas.

Durante este trabajo, Sturtevant y Bridges realizaron otras observaciones interesantes. Se demostró que el entrecruzamiento en *Drosophila* ocurría sólo en las hembras. El hecho de que no se diera entrecruzamiento en los machos hizo que el análisis de los mapas fuera mucho menos complejo en *Drosophila*. Sin embargo, en muchos otros organismos hay entrecruzamiento en ambos sexos.

Aunque se han llevado a cabo muchas mejoras en la cartografía cromosómica desde el trabajo inicial de Sturtevant, sus principios básicos se aceptan como correctos y se han utilizado para obtener mapas detallados de cromosomas de organismos en los que se conoce un gran número de genes mutantes ligados. Además de proporcionar las bases para la cartografía cromosómica, los hallazgos de Sturtevant fueron históricamente significativos para el campo de la genética. En 1910, la teoría cromosómica de la herencia era todavía objeto de mucha discusión. Incluso Morgan era escéptico de su teoría antes de llevar a cabo el grueso de sus experimentos. La investigación ha establecido firmemente que los cromosomas tienen genes en un orden lineal y que estos genes son equivalentes a los factores de Mendel.

Entrecruzamientos sencillos

¿Por qué influirá la distancia relativa entre dos loci en la cantidad de recombinación y entrecruzamiento observada entre ellos? Las bases de esta variación se explican en los siguientes análisis:

En la meiosis, en cada tétrada se da un número limitado de suceso de entrecruzamiento. Estos sucesos ocurren al azar a lo largo de la tétrada. Por consiguiente, cuanto más cercanos se encuentren dos loci a lo largo del eje de cromosoma, menos probable será que ocurra **un entrecruzamiento** entre ellos. El

[1] En honor al trabajo de Morgan, una unidad de mapa se denomina a menudo un centimorgan (cM).

mismo razonamiento sugiere que cuanto más alejados se encuentren dos loci es más probable que por azar ocurra entre ellos un entrecruzamiento.

En la Figura 5.5(a) hay un entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas, pero no entre los dos loci. Por consiguiente el entrecruzamiento queda sin detectarse porque no se han producido gametos recombinantes. En la Figura 5.5(b), en donde los dos loci se encuentran bastante alejados, el entrecruzamiento ocurre entre ellos. Esto los separa, dando lugar a gametos recombinantes.

Cuando hay un entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas, las otras dos cromátidas de la tétrada no quedan implicadas en este intercambio y pueden pasar intactas a los gametos. Al finalizar la meiosis, representan los gametos no recombinantes. En este caso, incluso si un entrecruzamiento ocurre en el 100 por ciento de las veces entre dos genes ligados, se observará posteriormente recombinación en solo el 50 por ciento de los gametos formados. Este concepto se esquematiza en la Figura 5.6. Teóricamente, si consideramos solo intercambios sencillos y observamos un 20 por ciento de gametos recombinantes, el entrecruzamiento realmente se da entre estos dos loci en el 40 por ciento de las tétradas. La regla general es que, en estas condiciones, el porcentaje de tétradas implicadas en un intercambio entre dos genes es el doble del de los gametos recombinantes producidos. Por consiguiente, el límite teórico de recombinación debida a entrecruzamiento es el 50 por ciento.

Cuando dos genes ligados están separados más de 50 unidades de mapa, teóricamente se puede esperar que ocurra un entrecruzamiento entre ellos en el 100 por ciento de las tétradas. Si esto se alcanzara, cada tétrada produciría los cuatro gametos de la Figura 5.6 en igual proporción, como si los genes estuvieran en cromosomas distintos y se transmitieran independientemente. Por una serie de razones, este límite teórico raramente se consigue.

¿Cómo lo sabemos?

¿Cómo se comprobó experimentalmente que la frecuencia de recombinación (entrecruzamiento) entre dos genes está relacionada con la distancia entre ellos?

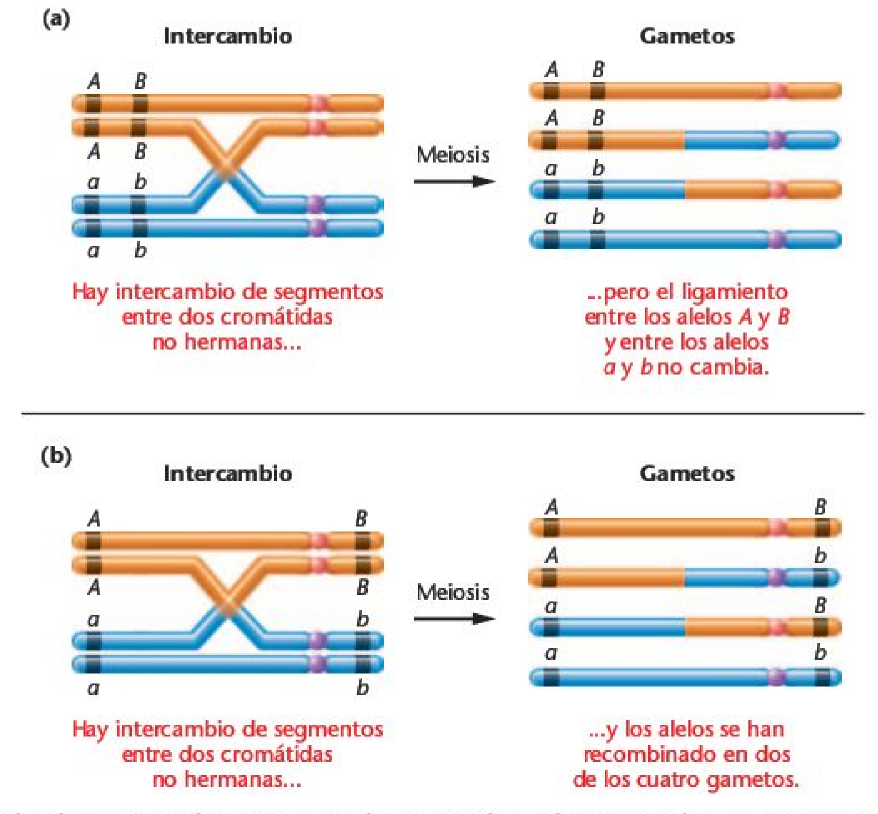


FIGURA 5.5 Dos ejemplos de una recombinación entre dos cromátidas no hermanas y los gametos que se producen posteriormente. En (a) el intercambio no altera las relaciones de ligamiento entre los alelos de los dos genes, formándose solo gametos paternos, quedando el intercambio sin detectar. En (b) el intercambio separa a los dos alelos dando lugar a gametos recombinantes, que son detectables.

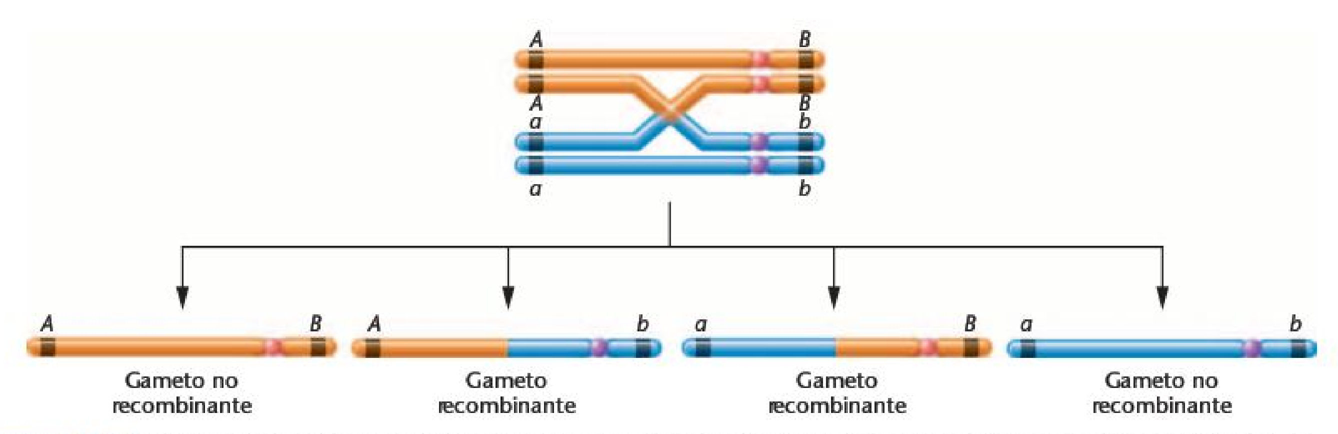


FIGURA 5.6 Consecuencias de un intercambio entre dos cromátidas no hermanas que se produce en el estadio de tétrada. Se producen dos gametos no recombinantes (paternos) y dos recombinantes.

5.3 La determinación de la secuencia génica en la confección de un mapa se basa en el análisis de los entrecruzamientos múltiples

El estudio de entrecruzamientos sencillos entre dos genes ligados proporciona la base para determinar la *distancia* entre ellos. Sin embargo, cuando se estudian muchos genes ligados, es más difícil determinar su *secuencia* a lo largo del cromosoma. Afortunadamente, el descubrimiento de que entre las cromátidas de una tétrada se dan intercambios múltiples ha facilitado el proceso de la construcción de mapas de cromosomas más amplios. Como veremos a continuación, cuando se investigan simultáneamente tres o más genes ligados, es posible determinar primero su secuencia y luego la distancia entre ellos.

Entrecruzamientos múltiples

Es posible que en una sola tétrada ocurran dos, tres o más intercambios entre cromátidas no hermanas como consecuencia de varios sucesos de entrecruzamiento. Los intercambios dobles de material genético dan lugar a **recombinantes dobles (DR)**, como se muestra en la Figura 5.7. Para estudiar un intercambio doble, se deben investigar tres pares de genes, cada uno de ellos heterozigoto para dos alelos. Antes de que podamos determinar la frecuencia de recombinación entre los tres loci, debemos revisar algunos cálculos sencillos de probabilidad.

Como ya hemos visto, la probabilidad de que ocurra un intercambio simple entre *A* y *B* o entre *B* y *C* es directamente proporcional a la distancia física entre cada locus. Cuanto más cercano esté *A* de *B*, o *B* de *C*, es menos probable que ocurra un intercambio simple entre cualquiera de los dos grupos de loci. En el caso de un entrecruzamiento doble, deben darse simultáneamente dos sucesos o intercambios distintos e independientes. La probabilidad matemática de que dos sucesos independientes ocurran simultáneamente es igual al producto de las probabilidades individuales. Esta es la ley del producto, que vimos anteriormente en el Capítulo 3.

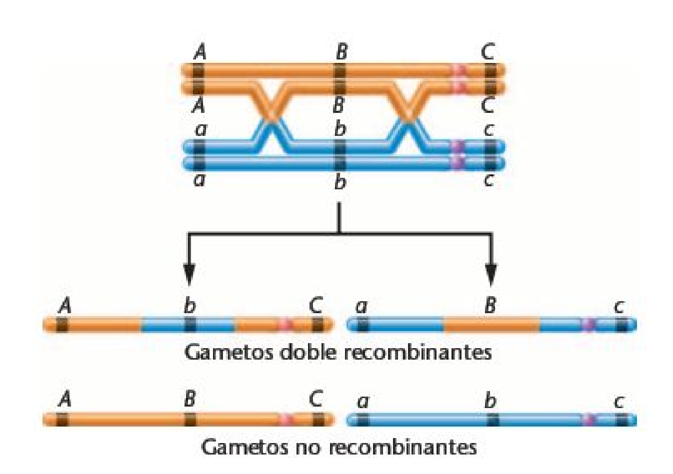
Supongamos que los gametos recombinados que resultan de un intercambio sencillo entre A y *B* se recupera el 20 por ciento de las veces ($p = 0{,}20$) y entre B y *C* en el 30 por ciento de las veces ($p = 0{,}30$). La probabilidad de recuperar un gameto doble recombinante que surja de dos intercambios, entre *A* y *B* y entre *B* y *C*, es $(0{,}20)(0{,}30) = 0{,}06$, o el 6 por ciento. Este cálculo demuestra que la frecuencia esperada de gametos recombinantes dobles es siempre mucho menor que cualquiera de los gametos recombinantes sencillos.

Si tres genes están relativamente próximos en un cromosoma, la frecuencia esperada de gametos recombinantes dobles es muy baja. Por ejemplo, supongamos que la distancia *A-B* en la Figura 5.7 sea de 3 um y que la distancia *B-C* sea de 2 um. La frecuencia esperada de recombinantes dobles sería $(0{,}03)(0{,}02) = 0{,}0006$, o el 0,06 por ciento. Esto supone solo 6 sucesos en 10.000. En un experimento de cartografiado como el descrito anteriormente, en el que están implicados genes íntimamente ligados, se necesitaría un gran número de descendientes para detectar dobles recombinantes. En este ejemplo, sería improbable que detectáramos un doble entrecruzamiento incluso si examináramos 1000 descendientes. Si ampliamos estas consideraciones sobre la probabilidad, es evidente que si tuviéramos que cartografiar cuatro o cinco genes, esperaríamos incluso menos triples y cuádruples entrecruzamientos.

Ahora resuelva esto

En el problema 5.14 de la página 147 se le pide que compare los resultados del entrecruzamiento cuando la situación de los alelos a lo largo de los homólogos difiere en un organismo heterozigoto para tres genes.

Sugerencia: Los homólogos presentan gametos no recombinantes sin cambio y todos los recombinantes resultantes deben de provenir de secuencia de alelos no recombinantes.



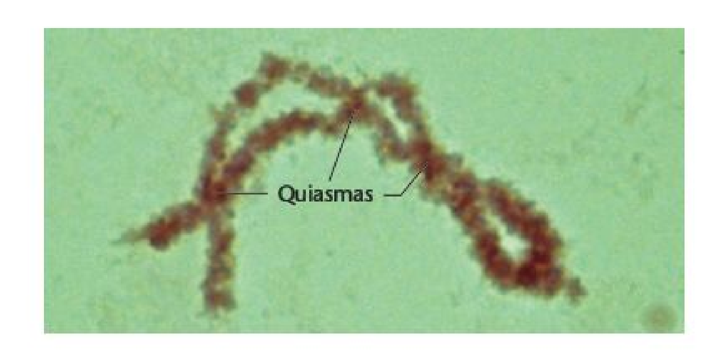


FIGURA 5.7 Consecuencias de un doble intercambio entre dos cromátidas no hermanas. Ya que el intercambio implica sólo a dos cromátidas, se producen dos gametos no recombinantes y dos doble recombinantes. La fotografía ilustra varios quiasmas en una tétrada aislada de la primera profase meiótica.

Mapa de tres puntos en *Drosophila*

La información presentada en las secciones anteriores sirve de base para cartografiar tres o más genes ligados en un solo cruce. Para explicar esto, examinemos una situación en la que se incluyen tres genes ligados. Para realizar un cruce de cartografía con éxito deben de cumplirse tres requisitos:

1. El genotipo del organismo que produce los gametos recombinados debe de ser heterozigoto para todos los loci en consideración. Si hay homozigosis en cualquier locus, todos los gametos producidos tendrán el mismo alelo, imposibilitando el análisis de cartografía.
2. El cruce se debe plantear de tal manera que pueda determinarse correctamente el genotipo de todos los gametos observando los fenotipos de los descendientes resultantes. Esto es necesario debido a que los gametos y sus genotipos nunca se pueden observar directamente. Para solventar este problema, cada clase fenotípica debe reflejar el genotipo de los gametos de los padres que los producen.
3. En el experimento de cartografía se debe obtener un número suficiente de descendientes para recuperar una muestra representativa de todas las clases recombinantes.

Estos criterios se cumplen en el cruce para un mapa de tres puntos de *Drosophila melanogaster* que se presenta en la Figura 5.8. En este cruce se consideran tres genes mutantes recesivos ligados al X —cuerpo de color *yellow* (amarillo), ojos de color *white* (blanco) y forma del ojo *echinus* (grandes y rugosos). Para hacer un esquema del cruce, debemos asumir algún orden teórico, aunque no sepamos todavía si es el correcto. En la Figura 5.8, asumiremos inicialmente que el orden de los tres genes es *y-w-ec*. Si esto no es correcto, nuestro análisis revelará el orden correcto.

En la generación P_1 se cruzan machos hemizigotos para los tres alelos silvestres con hembras homozigotas para los tres alelos mutantes recesivos. Por ello, los machos serán de tipo silvestre respecto del color del cuerpo, el color del ojo y la forma del mismo y se dice que tienen un fenotipo silvestre. Por otro lado, las hembras presentarán los tres caracteres mutantes: color del cuerpo *yellow*, ojos *white* y forma del ojo *echinus*.

Este cruce da lugar a una F_1 con hembras heterozigotas para los tres loci y machos que, debido al cromosoma Y, son hemizigotos para los tres alelos mutantes. Fenotípicamente, todas las hembras F_1 son de fenotipo silvestre, mientras que los machos F_1 son *yellow, white* y *echinus*. El genotipo de las hembras F_1 cumple el primer criterio para la construcción de un mapa de tres genes ligados; es decir, son heterozigotas para los tres loci y pueden servir de origen de gametos recombinantes generados por entrecruzamiento. Adviértase que debido a los genotipos de los padres P_1, los tres alelos mutantes se encuentran en un homólogo y los tres alelos de tipo silvestre en el otro. *Son posibles otras disposiciones.* Por ejemplo, las hembras heterozigotas F_1 podrían tener los alelos mutantes *y* y *ec* en un homólogo y el *w* en el otro. Esto se daría si, en el cruce P_1, un padre fuera *yellow* y *echinus* y el otro *white*.

En nuestro cruce, el segundo criterio se cumple en virtud de los gametos formados por los machos F_1. Cada gameto tendrá bien un cromosoma X con los tres alelos mutantes o un cromosoma Y, que no contiene ninguno de los tres loci en consideración. Cualquiera de los dos tipos que participe en la fecundación, el genotipo de los gametos producidos por la hembra F_1 se expresara fenotípicamente en las hembras y machos descendientes de F_2. Por ello, todos los gametos, recombinantes o no, producidos por las hembras F_1 se podrán detectar observando los fenotipos de F_2.

Cumplidos estos dos criterios, podemos construir un mapa cromosómico de los cruces presentados en la Figura 5.8, pero primero debemos determinar qué fenotipos de F_2 corresponden a las distintas categorías recombinantes y no recombinantes. Dos de estas se pueden determinar de manera inmediata.

Seminario Web 5.3
Mapa de tres puntos

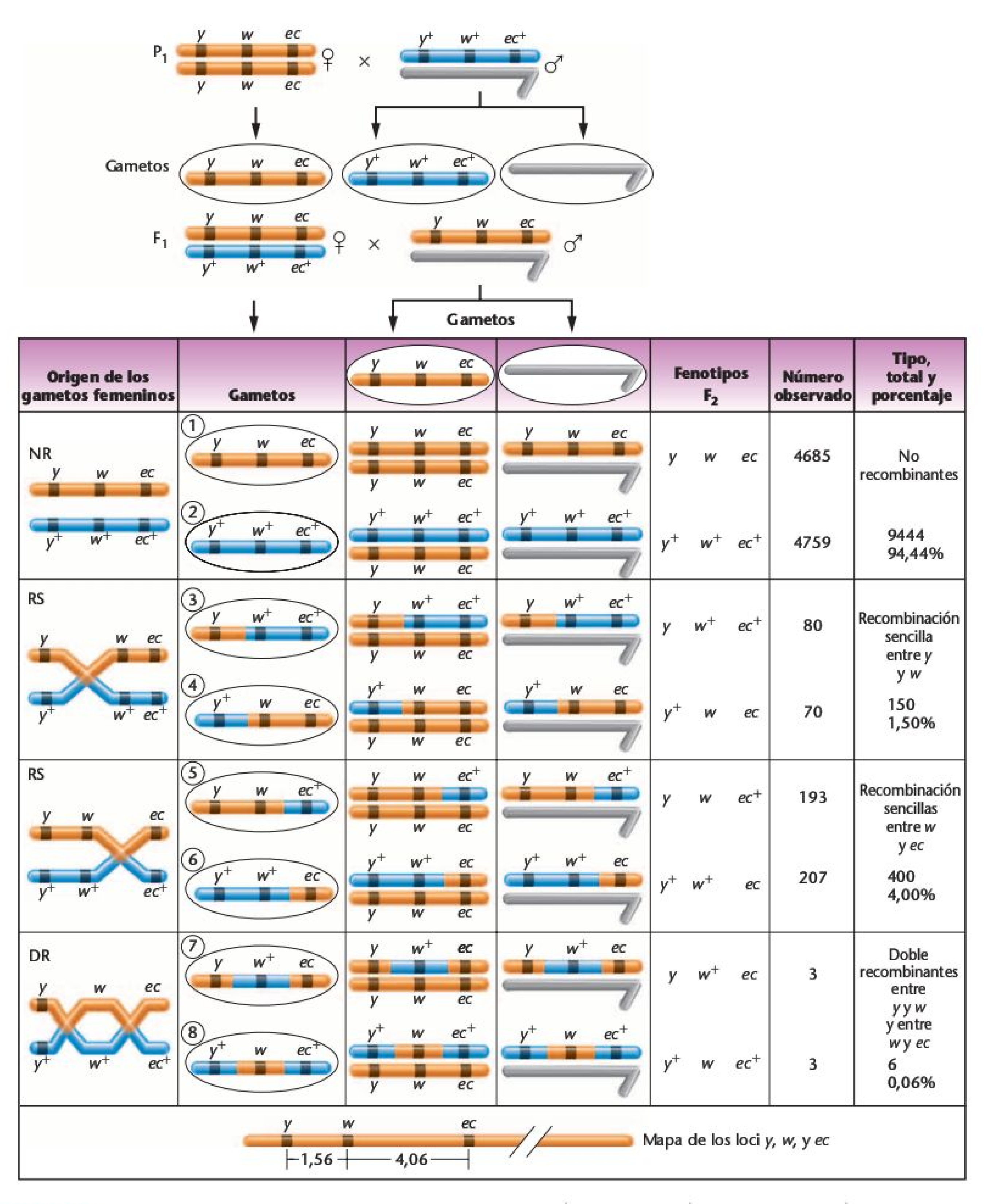


FIGURA 5.8 Cruce para un mapa de tres puntos de los genes *yellow* (y o y^+), *white* (w o w^+), y *echinus* (ec o ec^+) de *Drosophila melanogaster*. NR, RS, DR se refiere a grupos de no recombinantes, recombinantes sencillos y recombinantes dobles, respectivamente. Debido a la complejidad de esta y de varias de las figuras siguientes, no se han dibujado los centrómeros de los cromosomas, e inicialmente sólo se representan dos cromátidas no hermanas en la columna de la izquierda.

Los fenotipos **no recombinantes** de F_2 se determinan por la combinación de alelos presentes en los gametos formados por las hembras F_1. En este caso, cada gameto lleva los tres alelos silvestre o los tres alelos mutantes, dependiendo de en cuál de los cromosoma X no ha habido entrecruzamiento. Como consecuencia de la segregación, aproximadamente se producirá igual proporción de los dos tipos de gametos y de los correspondientes fenotipos F_2. Debido a que los fenotipos F_2 se complementan entre si (es decir, uno es de tipo silvestre y el otro es mutante para los tres genes), se llaman **clases recíprocas** de fenotipos.

Los dos fenotipos no recombinados son más fáciles de reconocer debido a que se encuentran en *una mayor proporción de los descendientes.* En la Figura 5.8 se muestra que los gametos (1) y (2) están presentes en mayor número. Por consiguiente, las moscas que son *yellow, white* y *echinus* y aquellas que son normales, o de tipo silvestre, para los tres caracteres, constituyen la categoría no recombinada y representan el 94,44 por ciento de los descendientes F_2.

La segunda clase que se puede detectar fácilmente está representada por los fenotipos doble recombinantes. Debido a su probabilidad de aparición, *deben encontrarse en el menor número.* Recuerde que este grupo representa dos entrecruzamientos independientes pero simultáneos. Se pueden identificar dos fenotipos recíprocos: gameto (7), que presenta los caracteres mutantes *yellow* y *echinus*, pero que tiene color de ojo normal; y gameto (8), que presenta el carácter mutante *white*, pero que tiene color del cuerpo y forma del ojo normales. Juntos, estos fenotipos doble recombinantes constituyen sólo el 0,06 por ciento de los descendientes de F_2.

Las cuatro clases fenotípicas restantes representan a dos categorías que resultan de entrecruzamientos sencillos. Los gametos (3) y (4), de fenotipos recíprocos, se producen por un entrecruzamiento entre los loci *yellow* y *white* y representan el 1,50 por ciento de los descendientes F_2. Los gametos (5) y (6) constituyen el 4,00 por ciento de los descendientes F_2, y representan los fenotipos recíprocos que resultan del entrecruzamiento entre los loci *white* y *echinus*.

Ahora podemos calcular la distancia de mapa para los tres loci. La distancia entre *y* y *w* o entre *w* y *ec* es igual al porcentaje de todos los intercambios detectados que ocurren entre ellos. Para cualesquiera dos genes, estos incluirán a todos los recombinantes sencillos más todos los dobles. Se incluye a los últimos debido a que representan dos entrecruzamientos sencillos simultáneos. Para los genes *y* y *w* estos incluyen las clases (3), (4), (7) y (8), que totalizan el 1,50 por ciento + 0,06 por ciento, o 1,56 um. De la misma manera, la distancia entre w y ec es igual al porcentaje de descendientes que resultan de un intercambio entre estos dos loci incluyendo los gametos (5), (6), (7) y (8), que totaliza el 4,00 por ciento + 0,06 por ciento, o 4,06 um. En la parte inferior de la Figura 5.8 se presenta el mapa de estos tres loci del cromosoma X basado en estos datos.

Determinación del orden de los genes

En el ejemplo anterior, se supuso que el orden o secuencia de los tres genes en el cromosoma era *y-w-ec*. Nuestro análisis ha confirmado que esta secuencia está de acuerdo con los datos. Sin embargo, en muchos experimentos de cartografía, no se conoce el orden de los genes, y esto constituye otra variable del análisis. Si el orden de los genes no se hubiera conocido en este ejemplo, podríamos haber utilizado uno de estos dos métodos (que se estudiarán a continuación) para determinarlo. Tendrá que seleccionar uno de estos métodos y utilizarlo en su propio análisis.

Método I. Este método se basa en el hecho de que solo hay tres posibles ordenaciones, cada una de ellas con uno de los genes en medio de los otros dos:

(I)	*w–y–ec*	(*y* está en medio)
(II)	*y–ec–w*	(*ec* está en medio)
(III)	*y–w–ec*	(*w* está en medio)

Los siguientes pasos nos permitirán determinar qué orden es el correcto:

1. Suponiendo cualquiera de las tres ordenaciones, determine primero la *situación de los alelos* en cada homólogo de los padres heterozigotos que dieron lugar a los gametos recombinantes y no recombinantes (las hembras F_1 de nuestro ejemplo).
2. Determine si ocurrió un doble entrecruzamiento en dicha situación como para producir los *fenotipos doble recombinantes observados.* Recuerde que estos fenotipos aparecen en menor frecuencia y pueden identificarse fácilmente.
3. Si este orden no produce los fenotipos correctos, inténtelo con cada una de las otras dos posibilidades. Una de las tres debe de funcionar!

Los pasos siguientes se muestran en la Figura 5.9 para el cruce que hemos discutido. Las tres ordenaciones posibles se señalan con (I),(II) y (III), como se indicó previamente. En medio debe de estar cualquiera de ellos, *y, ec* o *w*.

1. Si asumimos el orden I con *y* entre *w* y *ec*, la situación de los alelos en los homólogos de los heterozigotos F_1 es:

$$\frac{w \quad y \quad ec}{w^+ \quad y^+ \quad ec^+}$$

Sabemos esto debido al modo en que se cruzó la generación P_1. Las hembras P_1 contribuían con un cromosoma X que llevaba los alelos *w, y* y *ec*, mientras que el macho P_1 contribuyó con un cromosoma X con los alelos w^+, y^+, y ec^+.

2. Un doble entrecruzamiento en la situación anterior produciría los siguientes gametos:

$$\underline{w \quad y^+ \quad ec} \quad \text{y} \quad \underline{w^+ \quad y \quad ec^+}$$

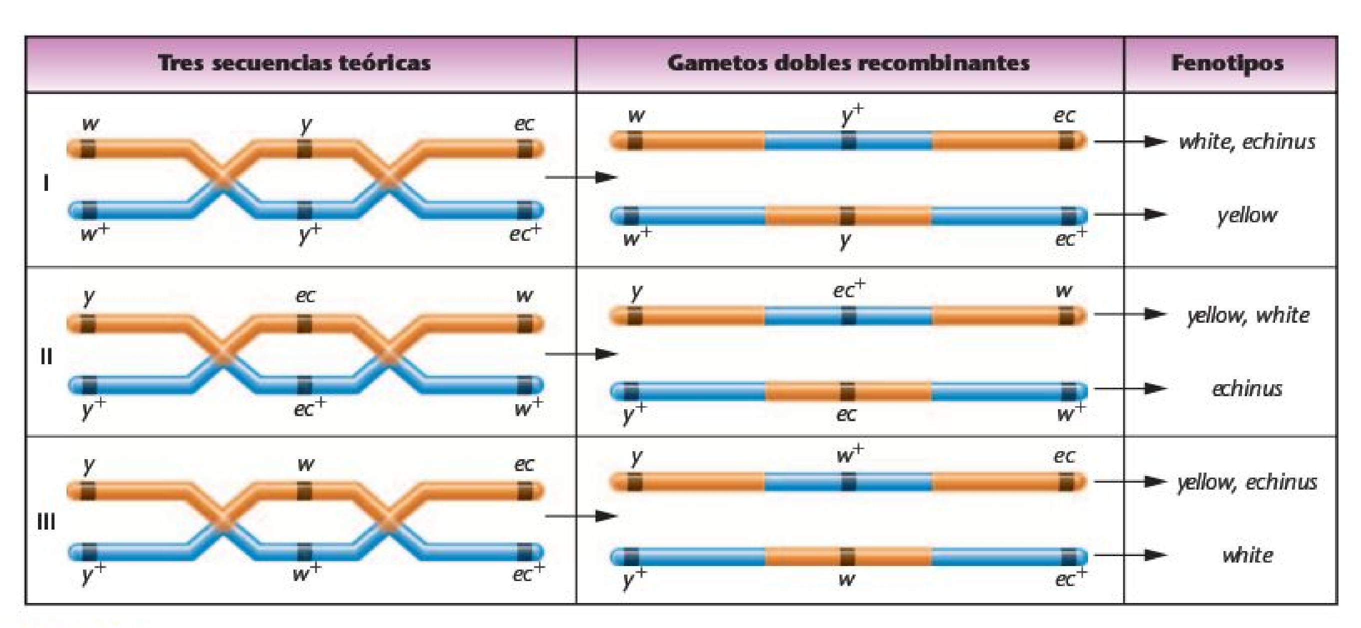


FIGURA 5.9 Las tres posibles secuencias de los genes *white, yellow* y *echinus*, los resultados de una recombinación doble en cada caso y los fenotipos resultantes que se producen en un cruce prueba. Para simplificar, se omiten las dos cromátidas no recombinantes de cada tétrada.

Después de la fecundación, si y está en medio, los fenotipos doble recombinantes de F_2 corresponderán a los genotipos gaméticos anteriores, dando lugar a descendientes que manifestarán los fenotipos *white, echinus* y a descendientes que serán *yellow*. Sin embargo, la determinación de los dobles entrecruzamientos reales revela que son moscas *yellow, echinus* y moscas *white*. Por consiguiente, nuestro orden supuesto es incorrecto.

3. Si consideramos las otras ordenaciones, una con los alelos ec/ec^+ en medio (II) o la otra con los alelos w/w^+ en medio (III), entonces:

$$\text{(II)}\ \frac{y \quad ec \quad w}{y^+ \quad ec^+ \quad w^+} \quad \text{o} \quad \text{(III)}\ \frac{y \quad w \quad ec}{y^+ \quad w^+ \quad ec^+}$$

vemos de nuevo que la situación II proporciona fenotipos doble recombinantes esperados que no se corresponden con los fenotipos doble recombinantes observados. Los fenotipos esperados en la generación F_2 son moscas *yellow, white* y moscas *echinus*. Por consiguiente esta ordenación también es incorrecta. Sin embargo, la situación III producirá los fenotipos observados, moscas *yellow, echinus* y moscas *white*. Por consiguiente, este orden, en donde el gen w está en medio, es el correcto.

Para resumir el método I, determine primero la situación de los alelos en los homólogos de los heterozigotos que producen gametos recombinantes. Esto se hace localizando los fenotipos recíprocos no recombinantes. Luego compruebe cada una de las tres posibles ordenaciones para determinar cuál de ellas produce los fenotipos doble recombinantes observados (reales). Cualquiera de las tres representará el orden correcto. Este método se resume en la Figura 5.9.

Método II. El método II comienza también asumiendo la situación de los alelos en cada uno de los homólogos de los padres heterozigotos. Además, se necesita una nueva suposición:

Después de un doble entrecruzamiento, el alelo que representa al gen central se encontrará entre los alelos externos o flanqueantes, que estaban en el homólogo paterno opuesto.

Para explicarlo, supongamos el orden (I), w-y-ec, en la siguiente situación:

$$\frac{w \quad y \quad ec}{w^+ \quad y^+ \quad ec^+}$$

Después de un doble entrecruzamiento, los alelos y e y^+ se encontrarán intercambiados en esta situación:

$$\frac{w \quad y^+ \quad ec}{w^+ \quad y \quad ec^+}$$

Después de la segregación se formarán dos gametos

$$\underline{w \quad y^+ \quad ec} \ \ \text{y} \ \ \underline{w^+ \quad y \quad ec^+}$$

Debido a que el genotipo del gameto se expresará directamente en el fenotipo después de la fecundación, los fenotipos doble recombinantes serán:

moscas *white, echinus* y moscas *yellow*

Advierta que el alelo *yellow*, que se supuso estaba en el medio, se encuentra ahora asociado con los dos marcadores externos del otro homólogo, w^+ y ec^+. Sin embargo, estos fenotipos esperados no coinciden con los fenotipos doble recombinantes observados. Por consiguiente el gen *yellow* no está en medio.

Este mismo razonamiento se puede aplicar a la suposición de que el gen *echinus* o el gen *white* están en medio. En el primer caso se alcanzará una conclusión negativa. Si asumimos que el gen *white* está en medio, los doble recombinantes esperados y observados coinciden. Por consiguiente concluimos que el gen *white* está localizado entre los genes *yellow* y *echinus*.

Para resumir el método II, determine la situación de los alelos en los homólogos de los heterozigotos que producen gametos recombinantes. Luego determine los fenotipos doble recombinantes reales. Seleccione simplemente el alelo que se ha intercambiado, por lo que ahora ya no se encontrará asociado con los alelos originalmente vecinos.

En nuestro ejemplo, *y*, *ec* y *w* se encuentran juntos en el heterozigoto F_1, al igual que y^+, ec^+, y w^+. En las clases F_2 doble recombinantes, son *w* y w^+ los que se han intercambiado. Ahora el alelo *w* está asociado con y^+ y ec^+, mientras que el alelo w^+ está asociado a los alelos *y* y *ec*. Por consiguiente el gen *white* está en medio y los genes *yellow* y *echinus* son los marcadores flanqueantes.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la base experimental para establecer la secuencia de genes a lo largo de un cromosoma en experimentos de cartografía?

Un problema de cartografía en el maíz

Habiendo establecido los principios básicos de la construcción de mapas cromosómicos, consideremos ahora un problema en el maíz, en donde se desconoce la secuencia de los genes y las distancias entre locus.

1. El cruce anterior para construir el mapa se refería a genes ligados al X. Aquí, los genes considerados son autosómicos.
2. En la discusión anterior, asumimos desde el principio una secuencia de los genes dada, y luego explicamos métodos para determinar si dicha secuencia u otra diferente era la correcta. En este análisis en el maíz, no se conoce inicialmente la secuencia.
3. En la discusión de este cruce utilizaremos símbolos diferentes para los alelos. En lugar de utilizar los símbolos bm^+, v^+, y pr^+, simplemente utilizaremos + para indicar cada uno de los alelos de tipo silvestre. Como se indicó en el Capítulo 4, esta notación es más fácil de manipular, aunque requiere una mejor comprensión del procedimiento de cartografía.

Este análisis difiere de la discusión anterior en varios aspectos y por consiguiente ampliará nuestro conocimiento de las técnicas de cartografía.

Cuando consideramos tres genes autosómicos ligados en el maíz, el cruce experimental debe cumplir los mismos criterios que establecimos para los genes ligados al X en *Drosophila*: (1) un padre tiene que ser heterozigoto para todos los caracteres en cuestión, (2) los genotipos gaméticos producidos por los heterozigotos deben ser aparentes al observar los fenotipos de los descendientes; y (3) debemos disponer de una muestra de tamaño suficiente.

En el maíz, los genes mutantes recesivos *bm* (nervadura *marrón*), *v* (brote *virescente*) y *pr* (aleurona *púrpura*) están ligados en el cromosoma 5. Supongamos que la planta que actúa de hembra es heterozigota para estos tres alelos. Nada se sabe acerca de la situación de los alelos mutantes en los homólogos paternos y maternos de estos heterozigotos, de la secuencia de los genes, o de la distancia de mapa entre los genes. ¿Qué genotipo debe tener la planta que actúa de macho para que la cartografía tenga éxito? Para cumplir con el segundo criterio, el macho tiene que ser homozigoto para los tres alelos mutantes recesivos. De otra manera, los descendientes de este cruce mostrarían un fenotipo dado que podría representar a más de un genotipo, haciendo imposible la realización adecuada del mapa. Adviértase que esto es equivalente a realizar un cruce prueba.

En la Figura 5.10 se esquematiza este cruce. Tal como se muestra, no sabemos ni la situación de los alelos, ni la secuencia de los loci en la hembra heterozigota. Se muestran algunas de las posibilidades, pero no hemos determinado todavía cual es la correcta. En el cruce prueba entre el macho paterno y los descendientes, *no conocemos la secuencia*, por lo que debemos asignarla al azar. Adviértase que hemos elegido situar *v* en medio. Esto puede ser o no correcto.

Los descendientes se han dispuesto en grupos de dos para cada par de clases fenotípicas recíprocas. Los dos miembros de cada clase recíproca provienen bien de la clase no recombinante (NR), de una de las dos posibles recombinaciones sencillas (RS) o de un doble entrecruzamiento (RD).

Para resolver este problema será útil referirse a las Figuras 5.10 y 5.11 cuando considere las cuestiones:

1. *¿Cuál es la situación correcta de los alelos en la planta femenina heterozigota?*

   Identifique las dos clases no recombinantes, aquellas que ocurren en mayor frecuencia. En este caso son $\underline{+\ \ v\ \ bm}$ y $\underline{pr\ \ +\ \ +}$. Por consiguiente, la situación de los alelos en los homólogos de la planta paterna femenina debe ser la que se presenta en la Figura 5.11(a). Estos homólogos segregan a lo gametos sin verse afectados por ningún entrecruzamiento. Cualquier otra situación de los alelos no podría producir las clases no recombinantes observadas.

   (Recuerde que $\underline{+\ \ v\ \ bm}$ es equivalente a $\underline{pr^+\ \ v\ \ bm}$ y que $\underline{pr\ \ +\ \ +}$ es equivalente a $\underline{pr\ \ v^+\ \ bm^+}$.)

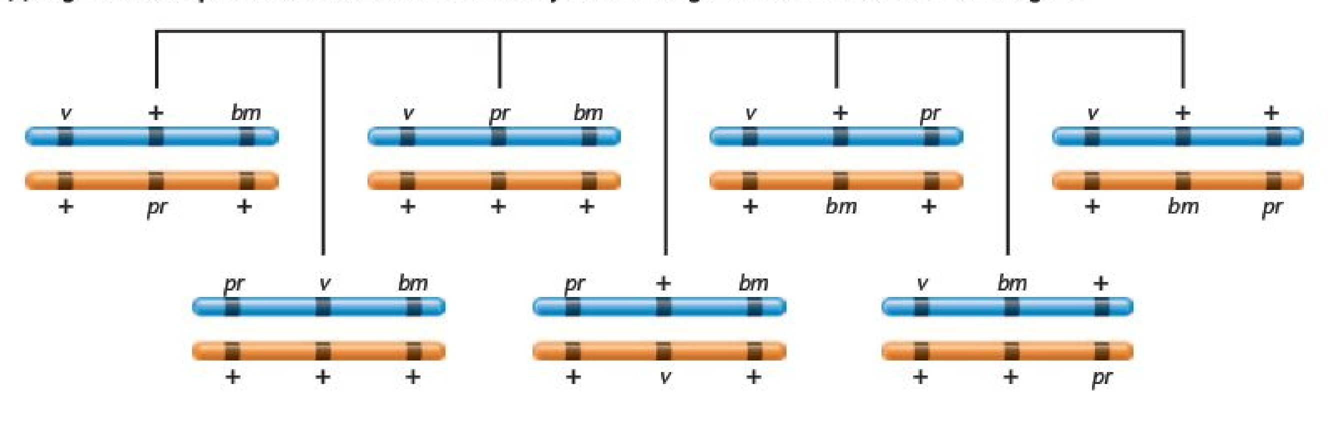
2. *¿Cuál es el orden correcto de los genes?*

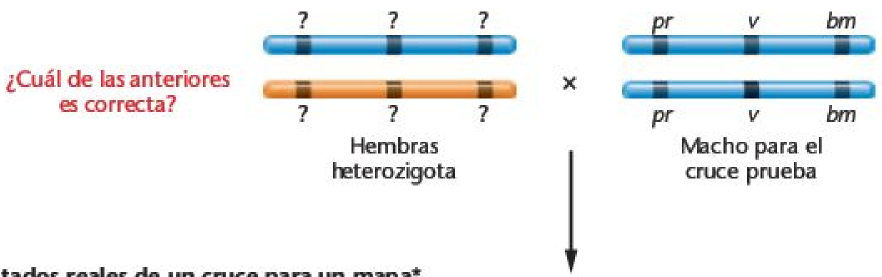
Para resolver esta cuestión utilizaremos primero el enfoque descrito en el método I. Basándonos en la respuesta a la cuestión 1, sabemos, que la situación correcta de los alelos es

$$\frac{+ \quad v \quad bm}{pr \quad + \quad +}$$

Pero, ¿es correcta esta supuesta secuencia? Si es así, un doble entrecruzamiento dará lugar después de la fecundación a los fenotipos doble recombinantes observados Una simple observación demuestra que no será así [Figura 5.11(b)]. Intente las otras dos ordenaciones [Figura 5.11(c) y (d)] *manteniendo la misma situación:*

(a) Algunas de las posibles situaciones de los alelos y secuencias génicas en una hembra heterozigota





(b) Resultados reales de un cruce para un mapa*

Fenotipos de los descendientes	Número	Total y porcentaje	Tipos de intercambio
+ *v* *bm*	230	467 42,1%	No recombinantes (NR)
pr + +	237		
+ + *bm*	82	161 14,5%	Recombinantes sencillos (RS)
pr *v* +	79		
+ *v* +	200	395 35,6%	Recombinantes sencillos (RS)
pr + *bm*	195		
pr *v* *bm*	44	86 7,8%	Doble recombinante (DR)
+ + +	42		

* La secuencia *pr* – *v* – *bm* puede o no ser correcta

FIGURA 5.10 (a) Algunas posibles situaciones de los alelos y las secuencias de genes en una hembra heterozigota. Los datos del cruce para un mapa de tres puntos, que se presentan en (b), en donde se ha realizado un cruce prueba con la hembra, proporcionan la base para determinar qué combinación de situación y secuencia es la correcta. [Véase la Figura 5.11(d).]

Seminario Web 5.4
Laboratorio virtual de recombinante

$$\frac{+ \quad bm \quad v}{pr \quad + \quad +} \quad \text{o} \quad \frac{v \quad + \quad bm}{+ \quad pr \quad +}$$

Solo el caso de la derecha dará lugar a las clases doble recombinantes observadas [Figura 5.11(d)]. Por consiguiente, el gen *pr* está en medio.

La misma conclusión se alcanza si el problema se analiza utilizando el método II. En este caso no es necesaria la suposición de una secuencia génica. La situación de los alelos en el padre heterozigoto es

$$\frac{+ \quad v \quad bm}{pr \quad + \quad +}$$

Los gametos doble recombinantes también son conocidos

$$\underline{pr \quad v \quad bm} \quad \text{y} \quad \underline{+ \quad + \quad +}$$

Podemos ver que el alelo *pr* ha cambiado, pasando a estar asociado con *v* y *bm* después de un doble entrecruzamiento. Los dos últimos alelos (*v* y *bm*) estaban juntos en un homólogo y se quedan juntos. Por consiguiente *pr* es el gen impar, por así decirlo, y está en medio. Así, llegamos a la misma situación y secuencia que con el método I:

$$\frac{v \quad + \quad bm}{+ \quad pr \quad +}$$

Situación de los alelos y su secuencia	Fenotipos del cruce prueba	Explicación
(a) + v bm / pr + +	+ v bm y pr + +	Los fenotipos no recombinantes proporcionan las bases para determinar la situación correcta de los alelos en los homólogos
(b) + v bm / pr + +	+ + bm y pr v +	Fenotipos doble recombinantes esperados si *v* está en medio
(c) + bm v / pr + +	+ + v y pr bm +	Fenotipos doble recombinantes esperados si *bm* está en medio
(d) v + bm / + pr +	v pr bm y + + +	Fenotipos doble recombinantes esperados si *pr* está en medio (Esta es la situación *real*.)
(e) v + bm / + pr +	v pr + y + + bm	Dado que (a) y (d) son correctos, se producen fenotipos recombinantes sencillos cuando el intercambio es entre *v* y *pr*
(f) v + bm / + pr +	v + + y + pr bm	Dado que (a) y (d) son correctos, se producen fenotipos recombinantes sencillos cuando el intercambio es entre *pr* y *bm*
(g) Mapa final: v — 22,3 — pr — 43,4 — bm		

FIGURA 5.11 Obtención del mapa de los tres genes del cruce de la Figura 5.10, en donde no se conoce ni la situación de los alelos ni la secuencia de los genes en la hembra heterozigota.

3. *¿Cuál es la distancia entre cada par de genes?*

Habiendo establecido la secuencia correcta de los loci, *v-pr-bm,* podemos ahora determinar la distancia entre *v* y *pr* y entre *pr* y *bm*. Recuerde que la distancia de mapa entre dos genes se calcula teniendo en cuenta todos los sucesos de recombinación detectables que se han dado entre ellos. Esto incluye tanto los sucesos sencillos como los dobles que impliquen a los dos genes en consideración.

En la Figura 5.11(e) se muestra que los fenotipos $\underline{v \;\; pr \;\; +}$ y $\underline{+ \;\; + \;\; bm}$ resultan de un entrecruzamiento sencillo entre *v* y *pr,* y en la Figura 5.10 se muestra que los entrecruzamientos sencillos explica el 14,5 por ciento de los descendientes. Añadiendo el porcentaje de los dobles recombinantes (7,8 por ciento) al número de recombinantes sencillos obtenido, calculamos que la distancia total entre *v* y *pr* es de 22,3 um.

En la Figura 5.11(f) se muestra que los fenotipos $\underline{v \;\; + \;\; +}$ y $\underline{+ \;\; pr \;\; bm}$ resultan de un entrecruzamiento sencillo entre los loci pr y bm, explicando el 35,6 por ciento de acuerdo con la Figura 5.10. Con la suma de la clase doble recombinante (7,8 por ciento) la distancia entre *pr* y *bm* queda en 43,4 um. El mapa final para los tres genes de este ejemplo se muestra en la Figura 5.11(g).

5.4 La interferencia afecta a la recuperación de los intercambios múltiples

Basándonos en la discusión anterior, la frecuencia esperada de intercambios múltiples, como la de los dobles entrecruzamientos, se puede predecir una vez que se conoce la distancia entre los genes. Por ejemplo, en el cruce del maíz de la sección anterior, la distancia entre *v* y *pr* es de 22,3 um, y la distancia entre *pr* y *bm* es de 43,4 um. Si los dos entrecruzamientos sencillos, que forman parte de un entrecruzamiento doble, se producen independientemente, podremos calcular la frecuencia esperada de recombinantes dobles (RD_{esp}):

$$DR_{esp} = (0{,}223) \times (0{,}434) = 0{,}097 = 9{,}7 \text{ por ciento}$$

Frecuentemente, en experimentos de cartografía, la frecuencia observada de DR es menor que el número esperado de DR. Por ejemplo, en el cruce del maíz solo se observó un 7,8 por ciento de DR, cuando se esperaba un 9,7 por ciento. Esta reducción se explica por el fenómeno llamado **interferencia,** que se produce cuando un entrecruzamiento en una región del cromosoma inhibe un segundo suceso en regiones cercanas.

Para cuantificar las diferencias que resultan de la interferencia, podemos calcular el **coeficiente de coincidencia (C):**

$$C = \frac{\text{DR observados}}{\text{DR esperados}}$$

En el cruce del maíz tendremos

$$C = \frac{0{,}078}{0{,}097} = 0{,}804$$

Una vez que se ha calculado C, la interferencia (I) se puede cuantificar utilizando la sencilla ecuación:

$$I = 1 - C$$

En el cruce del maíz tendremos

$$I = 1{,}000 - 0{,}804 = 0{,}196$$

Si la interferencia es completa y no se producen recombinantes dobles, entonces $I = 1$. Si hay menos DR de los esperados, I es un número positivo y se da **interferencia positiva.** Si hay más DR de los esperados, I es un número negativo y se da **interferencia negativa.** En este ejemplo, *I* es un número positivo (0,196), indicando que se ha dado un 19,6 por ciento menos de dobles recombinantes de los esperados.

En eucariotas lo más frecuente es observar interferencia positiva. En general, cuanto más próximos estén los genes, más interferencia positiva se observa. De hecho, en *Drosophila,* en una distancia de 10 unidades de mapa, la interferencia es a menudo completa (es decir, $I = 1$) y no se recuperan clases doble recombinantes. Nuestra observación sugiere que la interferencia puede explicarse por restricciones físicas que impiden la formación de quiasmas próximos. Esta interpretación está de acuerdo con el hecho de que la interferencia disminuye cuando los genes están más separados. En el cruce del maíz, que se ilustra en las Figuras 5.10 y 5.11, los tres genes están relativamente alejados y se observa el 80 por ciento de los dobles recombinantes esperados.

Ahora resuelva esto

En el problema 5.20 de la página 148 se le pide que resuelva un problema de cartografía de tres puntos, en donde sólo se han observado seis clases fenotípicas, cuando lo típico de estos cruces son ocho clases.

Sugerencia: Si la distancia entre cada par de genes es relativamente pequeña, los pares recíprocos de recombinantes sencillos serán evidentes, pero el tamaño de la muestra puede ser demasiado pequeño como para recuperar el número predicho de dobles recombinantes, excluyendo su aparición. Debería escribir los gametos que faltan, asignarlos como recombinantes dobles y ponerles cero en cuanto a su frecuencia de aparición.

5.5 A medida que la distancia entre dos genes aumenta, los experimentos de cartografía se hacen más imprecisos

En teoría, en un experimento de cartografía, se espera que la frecuencia de entrecruzamiento entre dos genes cualesquiera sea directamente proporcional a su distancia real. Sin embargo, en muchos casos, las distancias de mapa obtenidas experimentalmente entre dos genes están subestimadas, y cuanto más alejados estén, mayor será la imprecisión. La discrepancia se debe principalmente a los intercambios múltiples que se espera ocurran entre los dos genes, pero que no se recuperan en los experimentos de cartografía. Como explicaremos más adelante, esta imprecisión es consecuencia de las probabilidades que se pueden describir con la **distribución de Poisson.**

Examinemos primero un entrecruzamiento múltiple en un experimento de cartografía que implique dos intercambios entre dos genes que están alejados en el cromosoma. Como se muestra en la Figura 5.12, hay tres maneras posibles de que puedan darse dos intercambios (equivalentes a un doble entrecruzamiento) entre las cromátidas no hermanas de una tétrada. Un **intercambio doble entre dos cromátidas** no produce cromátidas recombinantes, un **intercambio doble entre tres cromátidas** produce un 50 por ciento de cromátidas recombinantes y un **intercambio doble entre las cuatro cromátidas** produce un 100 por ciento de cromátidas recombinantes. Por consiguiente, en conjunto estos raros sucesos múltiples «se compensan» y los dos genes que están alejados en el cromosoma producen teóricamente la máxima recombinación posible del 50 por ciento, esencial para una cartografía génica *precisa*.

En tal experimento de cartografía, los dobles intercambios (y, en relación con este asunto, todos los intercambios múltiples), son relativamente raros, en comparación con el número total de sucesos de recombinación sencillos. Como tal, los casos reales de aparición de sucesos raros están sujetos a la probabilidad basada en la distribución de Poisson. En nuestro caso, esta distribución nos permite predecir matemáticamente la frecuencia de las muestras que sufrirán *realmente* dobles intercambios. Es el fallo de que se den tales intercambios lo que conduce a que las distancias de mapa sean menores de las esperadas.

La distribución de Poisson es una función matemática que asigna la probabilidad de observar diversas veces un suceso específico en una muestra. Para ilustrar el efecto de la distribución de Poisson, consideremos la analogía de la búsqueda de huevos de Pascua, en donde 1.000 niños buscan al azar en una gran área 1.000 huevos escondidos al azar. En una hora se han

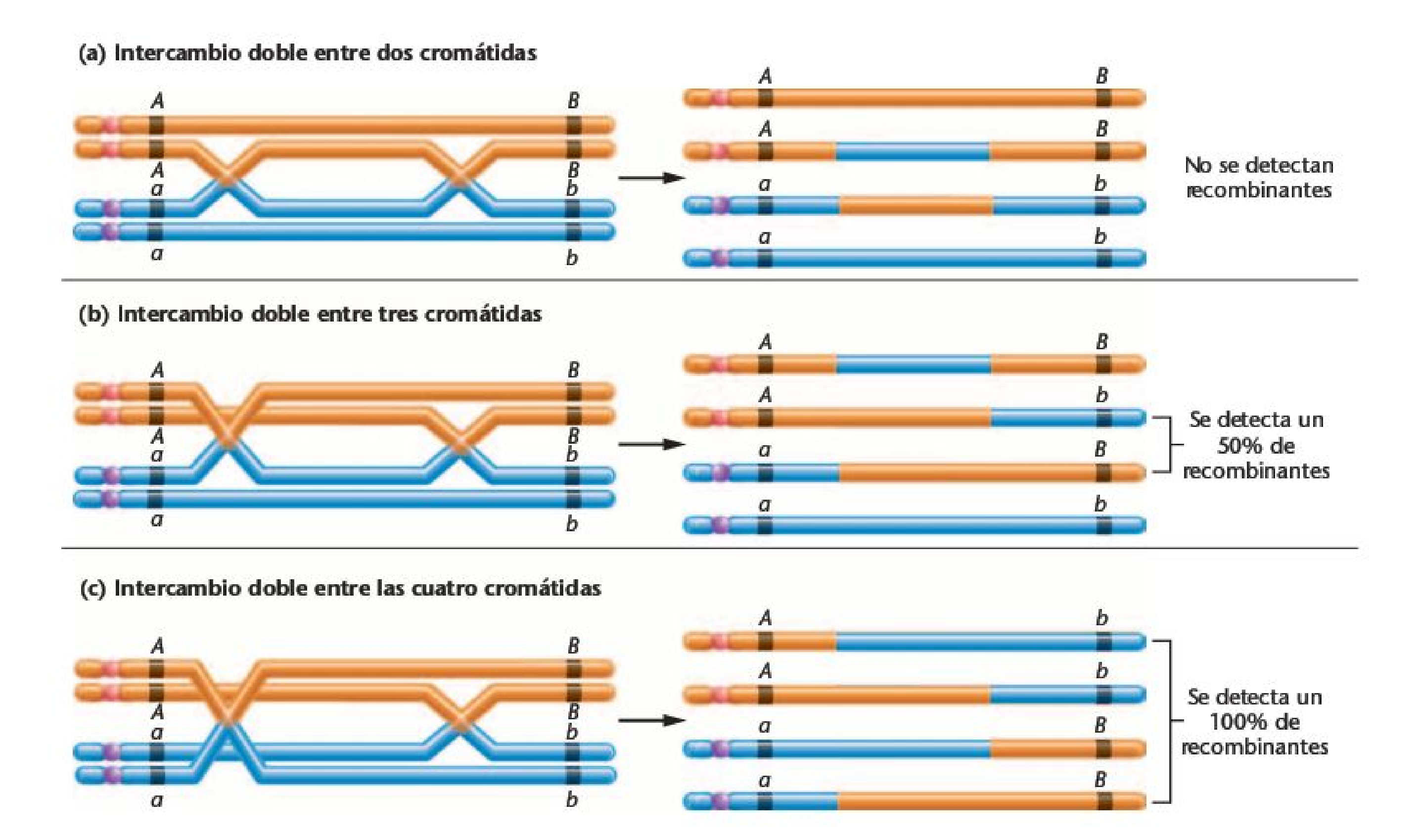


FIGURA 5.12 Tres tipos de intercambios dobles que se pueden producir entre dos genes. Dos de ellos, (b) y (c), implican a más de dos cromátidas. En cada caso, se señalan las cromátidas recombinantes detectables.

recuperado todos los huevos. Si todos los niños estuvieran igualmente interesados en la búsqueda, podríamos predecir con seguridad que muchos niños habrían encontrado un huevo, pero también que muchos no habrían encontrado ninguno o más de uno. La distribución de Poisson nos permite predecir matemáticamente las distintas frecuencias (probabilidades) de los resultados; es decir, la frecuencia de los niños que han encontrado 0, 1, 2, 3, 4,... huevos. La distribución de Poisson se aplica cuando el número promedio de sucesos es pequeño (un niño encuentra un huevo), mientras que el número total de veces que el suceso puede darse en la muestra es relativamente grande (se pueden encontrar 1000 huevos).

Los términos de la distribución de Poisson utilizados para calcular las distribuciones predichas de sucesos son

Distribución de sucesos	Probabilidad
0	e^{-m}
1	me^{-m}
2	$(m^2/2)(e^{-m})$
3	$(m^3/6)(e^{-m})$
etc.	

en donde *m* es el número medio de sucesos que se dan independientemente y *e* es la base de los logaritmos neperianos (*e* es alrededor de 2,7). Para el ejemplo de los huevos de Pascua el cálculo revelará que unos 300 niños no encontraron ningún huevo. Si hubiéramos intentado estimar el número total de jóvenes en la búsqueda tabulando el número que encontró al menos un huevo, habríamos subestimado seriamente el número de participantes en la búsqueda.

En relación con la cartografía de cromosomas, estamos interesados en los casos en donde, potencialmente, pueden darse intercambios dobles entre dos genes, pero debido a la predicción basada en la distribución de Poisson, no se dan tales intercambios en los datos de la muestra. Tal análisis da lugar a lo que se llama una **función de mapa** que relaciona la frecuencia de recombinación (FR) (entrecruzamientos) con la distancia en el mapa.

Ahora podemos aplicar la distribución de Poisson si asumimos que no hay interferencia. Cualquier clase en donde *m* sea uno o más (uno o más entrecruzamientos al azar) dará lugar, como promedio, a un 50 por ciento de cromátidas recombinadas. Por ello, estamos interesados en el término cero, que reduce efectivamente el número de cromátidas recombinantes. La proporción de meiosis con uno o más entrecruzamientos es igual a uno menos la fracción de cero entrecruzamientos ($1 - e^{-m}$), por lo que se dará un 50 por ciento de cromátidas recombinantes. Por consiguiente,

$$\text{porcentaje observado de recombinación (FR)} = 0{,}5\,(1-e^{-m}) \times 100$$

Si se resuelve esta ecuación, se genera la curva (función de mapa) que se presenta en el caso (b) de la Figura 5.13. Ésta se compara con el caso (a) hipotético de la Figura 5.13, en donde

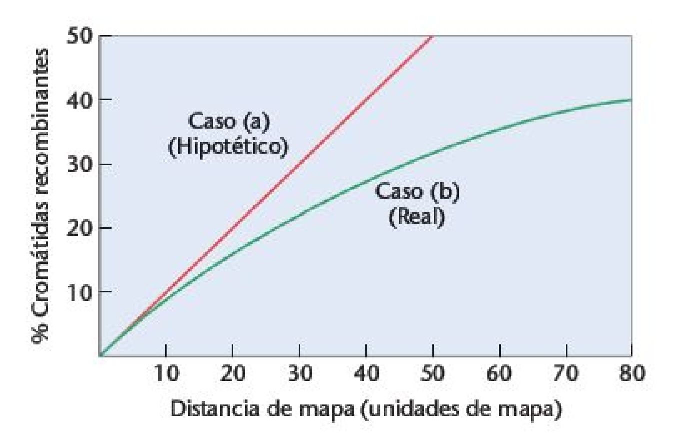


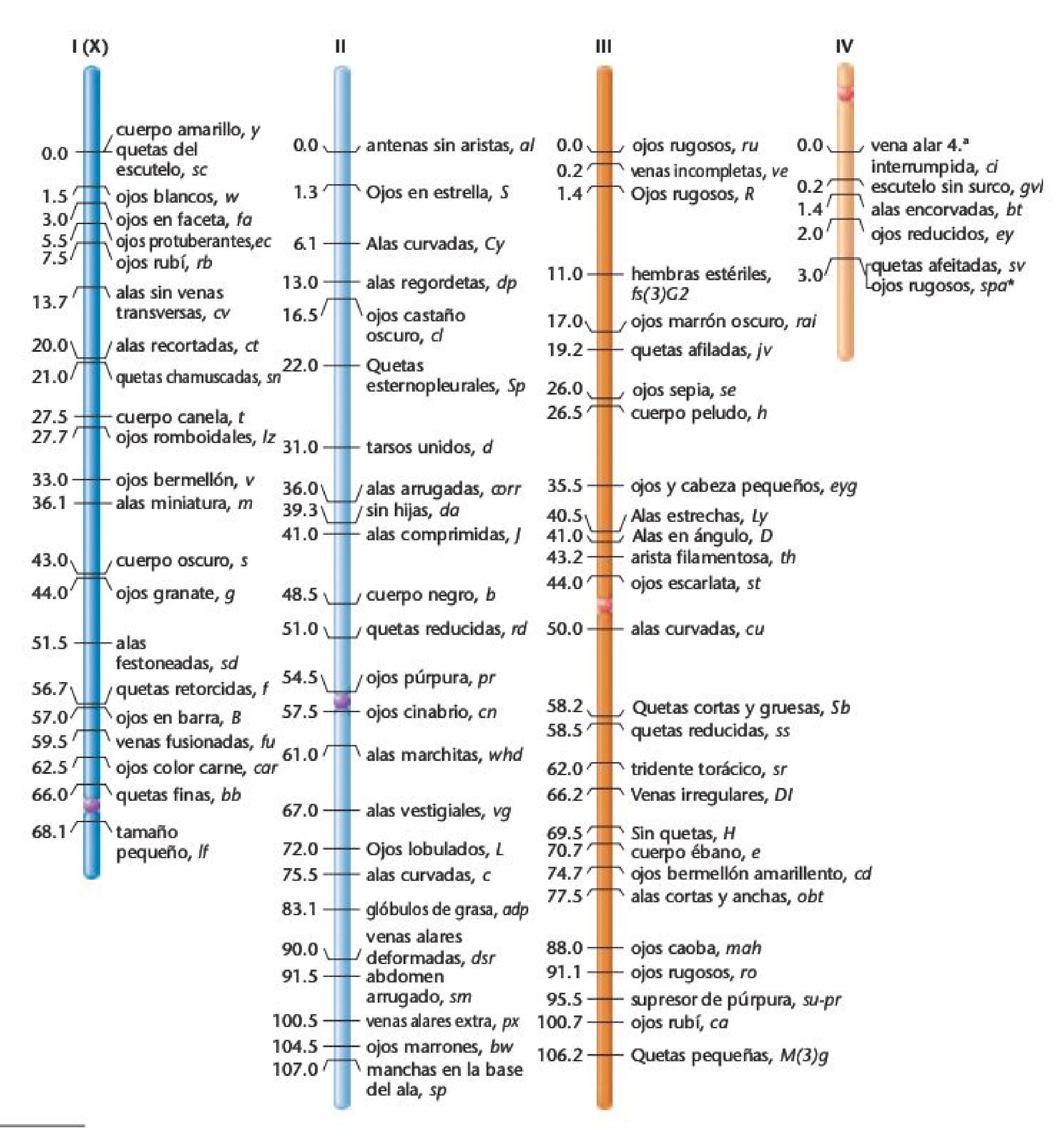
FIGURA 5.13 Relación entre el porcentaje de cromátidas recombinantes que se producen y la distancia real de mapa cuando (a) la relación entre recombinación y distancia de mapa es directa y (b) cuando se utiliza una distribución de Poisson para predecir la frecuencia de recombinación en relación con la distancia de mapa.

la recombinación es directamente proporcional a la distancia de mapa —es decir, en donde la interferencia es completa y no hay intercambios múltiples.

Un examen cuidadoso de este gráfico revela dos aspectos importantes. Cuando la distancia real de mapa es pequeña (p.e., 0-7 um), las dos líneas coinciden. *Cuando dos genes están muy juntos, la precisión de un experimento de cartografía es muy alta! Sin embargo, cuando la distancia entre dos genes aumenta, la precisión del experimento disminuye.* Como se predice por la distribución de Poisson, la ausencia de intercambios múltiples tiene un impacto muy significativo. Por ejemplo, cuando se detecta un 25 por ciento de cromátidas recombinantes, la distancia real de mapa es casi de 35 um! Cuando los recombinantes detectados son alrededor del 30 por ciento, la distancia real, descontando la interferencia, es de 50 um! Tales diferencias están muy bien documentados en muchos experimentos con distintos organismos, como el maíz, *Drosophila* y *Neurospora*.

5.6 Los genes de *Drosophila* han sido ampliamente cartografiados

En organismos como *Drosophila*, el maíz o el ratón, en donde se han descubierto un gran número de mutantes y es fácil realizar cruces experimentales, se han llevado a cabo extensos mapas de cada cromosoma. En la Figura 5.14 se presentan mapas parciales de los cuatro cromosomas de *Drosophila*. Prácticamente se ha observado que para cada rasgo morfológico de la mosca del vinagre hay mutaciones. Cada locus afectado por mutación se localiza primero en uno de los cuatro cromosomas, o grupos de ligamiento, y luego se cartografía en relación con otros genes ligados a dicho grupo. Como se puede ver, el mapa genético del cromosoma X es



* *Nota del traductor*: se ha tratado de traducir y adaptar lo más fielmente posible la descripción del fenotipo de los mutantes que figuran en este mapa. A la derecha, en cursivas, están la inicial o iniciales del nombre inglés del correspondiente alelo mutante. Para una mejor descripción del fenotipo de estos alelos mutantes, véase Lindsley y Grell, citado al final de este capítulo.

FIGURA 5.14 Mapa genético parcial de los cuatro cromosomas de *Drosophila melanogaster.* El círculo en cada cromosoma indica la situación del centrómero.

algo menos extenso que el de los autosomas 2 y 3. En comparación con estos tres, el autosoma 4 es minúsculo. Basándonos en pruebas citológicas, se ha encontrado que las longitudes relativas de los mapas genéticos se correlacionan a groso modo con las longitudes físicas relativas de estos cromosomas.

5.7 El entrecruzamiento implica un intercambio físico entre cromátidas

Una vez que se entendió la cartografía genética, se buscó información sobre la relación entre los quiasmas observados en la pro-

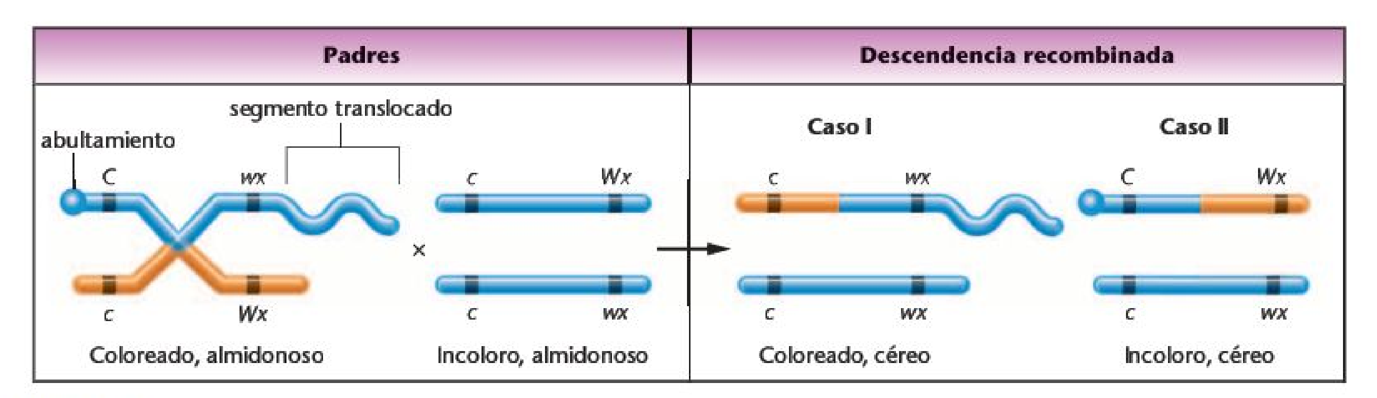


FIGURA 5.15 Fenotipos y estructura de los cromosomas de los padres y de los descendientes recombinantes, del experimento de Creighton y McClintock en el maíz. El abultamiento y el segmento translocado sirven de marcadores citológicos para establecer que el entrecruzamiento implica un intercambio real entre los brazos cromosómicos.

fase I de la meiosis y el entrecruzamiento. Por ejemplo, los quiasmas ¿son manifestaciones visibles de sucesos de recombinación? Si es así, entonces el entrecruzamiento en organismos superiores parece que es el resultado de un intercambio físico entre cromosomas homólogos. Que este es el caso lo demostraron independientemente en la década de 1930 Harriet Creighton y Barbara McClintock en *Zea mays* y Curt Stern en *Drosophila*.

Debido a que los experimentos son semejantes, consideraremos sólo uno de ellos, el llevado a cabo en el maíz. Creighton y McClintock estudiaron dos genes ligados en el cromosoma 9 del maíz. En un locus, los alelos *colorless* (c) (incoloro) y *colored* (C) (coloreado) controlan la coloración del endospermo. En el otro locus, los alelos *starchy (Wx)* (almidonoso) y *waxy (wx)* (céreo) controlan las características de los hidratos de carbono del endospermo. La planta de maíz estudiada era heterozigota para ambos loci. La clave del experimento fue que uno de los homólogos tenía dos marcadores citológicos especiales. Los marcadores consistían en un abultamiento que se teñía fuertemente en un extremo del cromosoma y un trozo translocado de otro cromosoma (8) en el otro extremo. En la Figura 5.15 se presenta la situación de los alelos y de los marcadores que pueden ser detectados citológimente.

Creighton y McClintock cruzaron esta planta con una homozigota para el alelo para color (c) y heterozigota para los alelos del endospermo. Obtuvieron una serie de fenotipos distintos entre los descendientes, pero estaban más interesadas en uno que se daba como consecuencia del entrecruzamiento entre los cromosomas con los marcadores citológicos. Examinaron los cromosomas de esta planta, con fenotipo incoloro y céreo (caso I de la Figura 5.15), para ver los marcadores citológicos. Si el entrecruzamiento va acompañado de intercambio físico entre los homólogos, se observará el cromosoma translocado, pero no el abultamiento. ¡Y eso fue lo que se observó! En otra planta (caso II), el fenotipo coloreado y almidonoso podría ser el resultado bien de gametos sin recombinar o por entrecruzamiento. Algunos de los casos deberían tener cromosomas con el abultamiento, pero sin el cromosoma translocado. Esto también se observó, y de nuevo los hechos apoyaron la conclusión de que había tenido lugar un intercambio físico. Juntamente con los descubrimientos de Stern en *Drosophila*, el trabajo estableció claramente que el entrecruzamiento tiene una base citológica.

Una vez que hayamos introducido los temas de la estructura química y de la replicación de DNA (Capítulos 10 y 11), volveremos al entrecruzamiento y buscaremos cómo se produce la rotura y reunión entre las cadenas de DNA que constituyen los cromosomas. Esta discusión proporcionará una mejor comprensión de la recombinación genética

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la base experimental para concluir que el entrecruzamiento implica un intercambio físico real entre homólogos en la meiosis?

5.8 La recombinación se produce entre cromosomas mitóticos

En 1936, Curt Stern consideró si se daban intercambios similares al entrecruzamiento en la mitosis. Pudo demostrar que esto era cierto en *Drosophila*. Este descubrimiento, el primero en demostrar la **recombinación mitótica**, se consideró raro debido a que los homólogos normalmente no se aparean en la mitosis en la mayoría de los organismos. Sin embargo, tal sinapsis parece ser la regla en *Drosophila*. Desde el descubrimiento de Stern, se ha demostrado que el intercambio genético también es un hecho corriente en la mitosis de ciertos hongos.

Stern observó pequeñas manchas de tejido mutante en hembras heterozigotas para las mutaciones recesivas ligadas al X cuerpo *yellow* (amarillo) y quetas *singed* (chamuscadas). En circunstancias normales una hembra heterozigota es totalmente de tipo silvestre (cuerpo gris con quetas rectas y largas). Explicó la aparición de las manchas mutantes proponiendo que, en la mitosis durante el desarrollo de ciertas células, podía ocurrir intercambio entre homólogos entre los loci para *yellow (y)* y *singed (sn)* o entre *singed* y el centrómero. En la Figura 5.16 se esque-

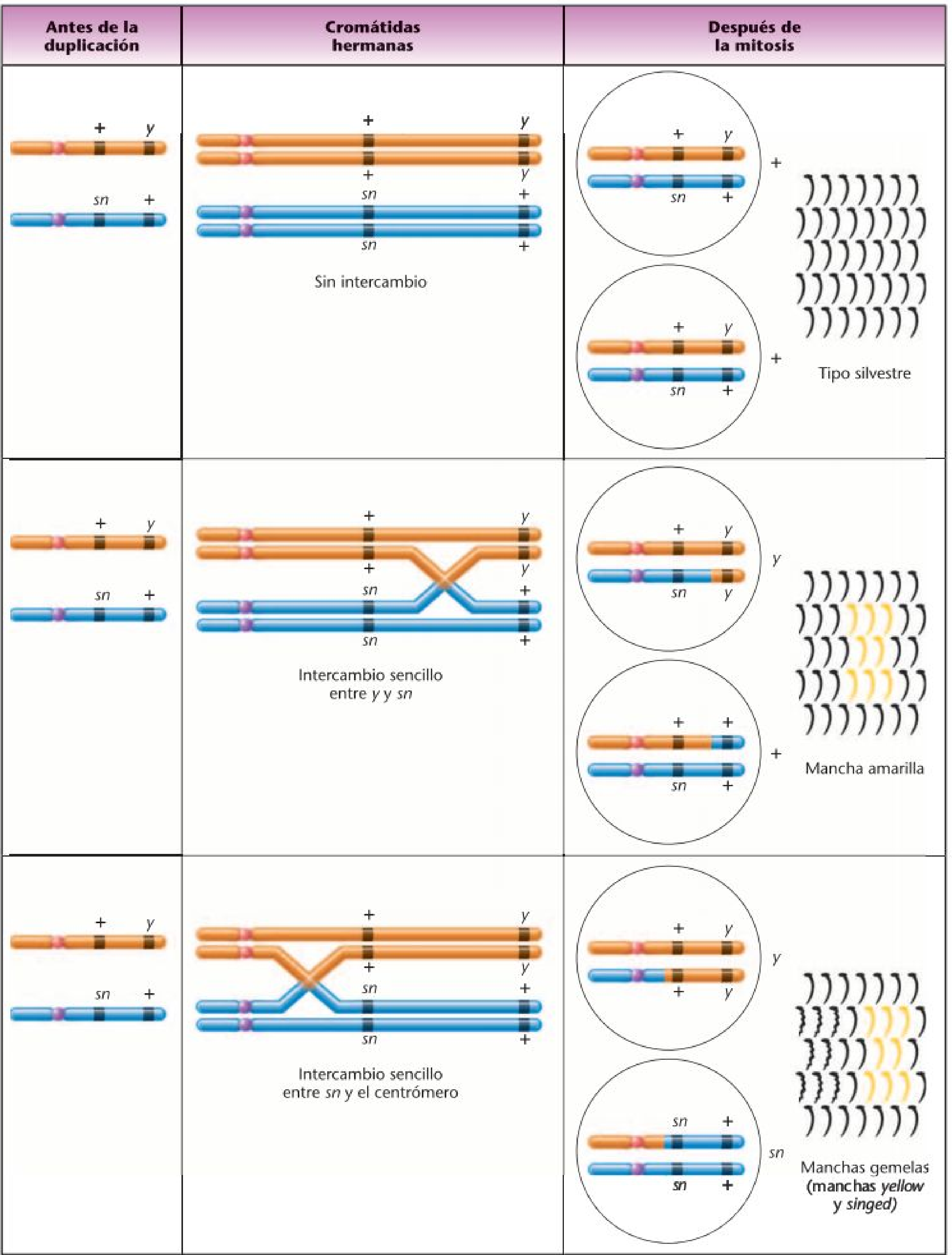


FIGURA 5.16 Producción de tejido mutante en una hembra de *Drosophila*, heterozigota para los alelos recesivos *yellow (y)* y *singed (sn)*, como consecuencia de recombinación mitótica.

matiza la naturaleza de los intercambios propuestos, en contraste con el caso en donde no hay intercambios. También se representan las manchas mutantes que se producirán. Cuando no hay intercambios, todos los tejidos son del tipo silvestre (cuerpo gris y quetas rectas y negras). Según estos dos tipos de intercambio, se producen tejidos bien con manchas *yellow*, o con manchas adyacentes *yellow* y *signed* (llamadas manchas gemelas).

En 1958, George Pontecorvo y otros describieron un fenómeno similar en el hongo *Aspergillus.* Aunque el estadio vegetativo es normalmente haploide, algunas células se fusionan: Las células diploides resultantes se dividen luego mitóticamente. Como en *Drosophila,* ocasionalmente hay entrecruzamiento en la mitosis entre genes ligados en dicha situación diploide, dando lugar a células recombinantes. Potecorvo se refirió a estos hechos que producen variabilidad genética como al **ciclo parasexual.** De acuerdo con estos intercambios, se pueden cartografiar genes estimando la frecuencia de las clases recombinantes.

En general, si hay recombinación mitótica en un organismo, se produce en mucha menor frecuencia que el entrecruzamiento meiótico. Se supone que en la meiosis hay siempre al menos un intercambio por tétrada. En contraste, en los organismos que presentan intercambio mitótico, este se produce en un 1 por ciento o menos de las divisiones mitóticas.

5.9 Entre cromátidas hermanas también se producen intercambios

Sabiendo que el entrecruzamiento se da entre los homólogos en sinapsis en la meiosis, podríamos preguntarnos si tal intercambio físico ocurre entre los homólogos en la mitosis. Mientras que los cromosomas homólogos normalmente no se aparean en las células somáticas de los organismos diploides (*Drosophila* es una excepción), en la profase y en la metafase de la mitosis cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas idénticas, unidas por un centrómero común. Sorprendentemente, ciertos experimentos han demostrado que entre cromátidas hermanas se dan intercambios recíprocos similares al entrecruzamiento. Aunque estos **intercambios entre cromátidas hermanas** (ICH) no dan lugar a nuevas combinaciones alélicas, se están acumulando pruebas de que concede significado a estos hechos.

La identificación y el estudio de los ICH vienen facilitados por varias técnicas modernas de tinción. En un caso, se permite que las células se repliquen durante dos generaciones en presencia de la bromodesoxiuridina (BUdR)[2] análoga de la timidina. Después de dos rondas de replicación, una de las dos cromátidas hermanas queda con ambas cadenas marcadas con BUdR. Utilizando una tinción diferencial, se encuentra que las cromátidas con el análogo en ambas cadenas se tiñen menos fuertemente que las cromátidas marcadas en una sólo cadena. En consecuencia, si ha habido ICH se detecta fácilmente. En la Figura 5.17 son muy evidentes varios sucesos de ICH. Debido a la apariencia parcheada, estas cromátidas hermanas se denominan a menudo **cromosomas arlequín.**

Aunque el significado del ICH todavía no está claro, varias observaciones han dado gran interés a este fenómeno. Por ejemplo, se sabe que agentes que inducen daño cromosómico (como virus, rayos X, luz ultravioleta y ciertos mutágenos químicos) también incrementan la frecuencia del ICH. Además, es característico del **síndrome de Bloom,** una enfermedad humana ocasionada por una mutación en el gen *BLM* del cromosoma 15, una elevada frecuencia de ICH. Esta rara enfermedad hereditaria recesiva se caracteriza por un retraso prenatal y postnatal del crecimiento, una gran sensibilidad de la piel de la cara al sol, deficiencia inmunitaria, predisposición a la aparición de tumores benignos y malignos y patrones anormales de comportamiento. Los cromosomas de cultivos de leucocitos, de células de médula ósea y de fibroblastos, derivados de homozigotos, son muy frágiles e inestables cuando se los compara con los derivados de homozigotos y herterozigotos de individuos normales. Se observa un aumento de las roturas y de las reordenaciones entre cromosomas no homólogos, además de una cantidad excesiva de intercambios entre cromátidas hermanas. Se sabe ahora que el gen *BLM* codifica una enzima llamada **helicasa del DNA,** que se conoce mejor por su papel en la replicación del DNA (véase el Capítulo 11).

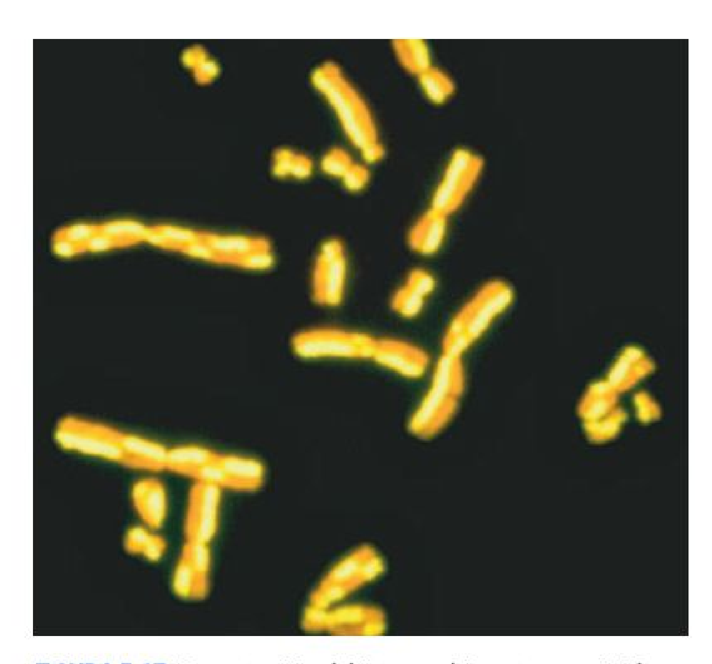


FIGURA 5.17 Demostración del intercambio entre cromátidas hermanas (ICH) en cromosomas mitóticos. Llamados a veces cromosomas arlequín, debido a su apariencia, las cromátidas que tienen el análogo de la timidita BUdR en ambas cadenas del DNA dan una fluorescencia menos brillante que aquellas que tienen el análogo en una sola cadena. Estos cromosomas se tiñeron con el colorante de Hoechst 33258 y naranja de acridina, y luego se observaron con un microscopio de fluorescencia.

[2] Para designar a la bromodesoxiuridina también se utiliza la abreviatura BrdU.

El mecanismo de intercambio entre cromosomas no homólogos y entre cromátidas hermanas puede compartir rasgos comunes, debido a que la frecuencia de ambos hechos aumenta sustancialmente en individuos con trastornos genéticos. Estos hechos sugieren que un estudio a fondo del intercambio entre cromátidas hermanas puede contribuir a una mejor comprensión del mecanismo de recombinación y de la relativa estabilidad de los cromosomas normales y anormales genéticamente. Encontraremos otra demostración del ICH en el Capítulo 11 cuando consideremos la replicación del DNA. (Véase la Figura 11.5.)

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que las cromátidas hermanas sufren recombinación en la meiosis?

5.10 En organismos haploides se puede realizar el análisis del ligamiento y la confección de mapas

Volvemos ahora a otra ampliación de nuestro estudio de la genética de la transmisión: el análisis del ligamiento y la realización de mapas cromosómicos en eucariotas haploides. Como veremos, aun cuando el análisis de la localización de genes en el genoma de los organismos haploides puede *parecer* un poco más complicado que en organismos diploides, los principios básicos subyacentes son los mismos. De hecho, muchos principios básicos de la herencia se establecieron con el estudio de hongos haploides.

Aunque muchos eucariotas unicelulares son haploides durante los estadios vegetativos de su ciclo biológico, también forman células reproductivas que se fusionan en la fecundación y dan lugar a un zigoto diploide. Luego el zigoto sufre meiosis y se restablece la haploidía. Los productos meióticos haploides son los progenitores de los miembros siguientes de la fase vegetativa del ciclo biológico. En la Figura 5.18 se representa este tipo de ciclo en el alga verde *Chlamydomonas*. Aun cuando las células haploides que se fusionan en la fecundación *parecen* idénticas (y por ello se denominan **isogametos**), en su superficie hay diferencias químicas que permite clasificarlas en dos tipos distintos. Por ello, todas las cepas son o bien «+» o bien «−» y la fecundación ocurre sólo entre células diferentes.

Para realizar experimentos genéticos con organismos haploides, se aíslan cepas de genotipos diferentes y se cruzan entre si. Después de la fecundación y de la meiosis, los productos meióticos quedan juntos y se pueden analizar. Tal es el caso de

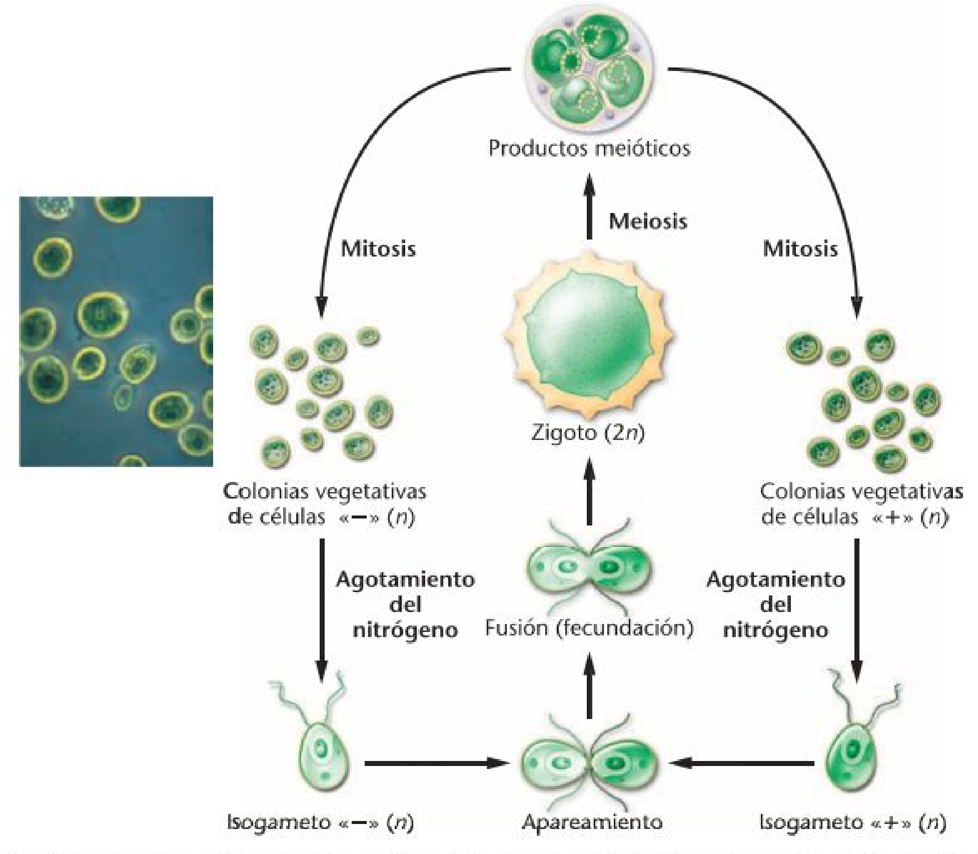


FIGURA 5.18 Ciclo biológico de *Chlamydomonas*. El zigoto diploide (en el centro) sufre meiosis, dando lugar a células haploides «+» y «−» que sufren mitosis, produciendo colonias vegetativas. Las condiciones desfavorables estimulan la formación de isogametos, que se fusionan en la fecundación, produciendo un zigoto que repite el ciclo. En la fotografía se muestran colonias vegetativas.

Chlamydomonas o del hongo *Neurospora*, que utilizaremos como ejemplo en la discusión que sigue. En *Neurospora*, después de la fecundación (Figura 5.19) se produce la meiosis en una estructura en forma de saco llamada **asca** y en su interior queda el grupo inicial de productos haploides, llamado **tétrada** La tétrada tiene aquí un significado completamente distinto del que se utilizó para describir la configuración cromosómico de cuatro filamentos característica de la profase I de la meiosis en diploides.

En Neurospora, después de la meiosis, cada célula del asca se divide por mitosis, dando lugar a ocho **ascosporas** haploides. Estas se pueden extraer y examinar su morfología o comprobar sus genotipos y fenotipos. Debido a que las ocho células reflejan el *orden* en el que se han formado después de la meiosis, se dice que la tétrada es «ordenada» y podemos hacer un **análisis de tétradas ordenadas**. Este proceso es esencial para nuestra discusión siguiente.

Mapas de gen a centrómero

Cuando se analiza un gen (*a*) en *Neurospora*, como se esquematiza en la Figura 5.20, los datos se pueden usar para calcular la distancia de mapa entre dicho gen y el centrómero. Este proceso se denomina a veces como la **cartografía del centrómero**. Se puede realizar determinando experimentalmente la frecuencia de recombinación usando datos de tétradas. Recuerde que una vez se han formado los cuatro productos meióticos, se produce una división mitótica que da lugar a ocho productos ordenados (ascosporas).

Si no hay entrecruzamientos entre el gen en estudio y el centrómero, el patrón de las ascosporas (que se encuentran dentro de un asca) aparece como se muestra en la Figura 5.20(a) (*aaaa* ++++). También se puede formar el patrón (++++*aaaa*), aunque no se distingue del (*aaaa*++++). Estos patrones representan la **segregación en la primera divi-**

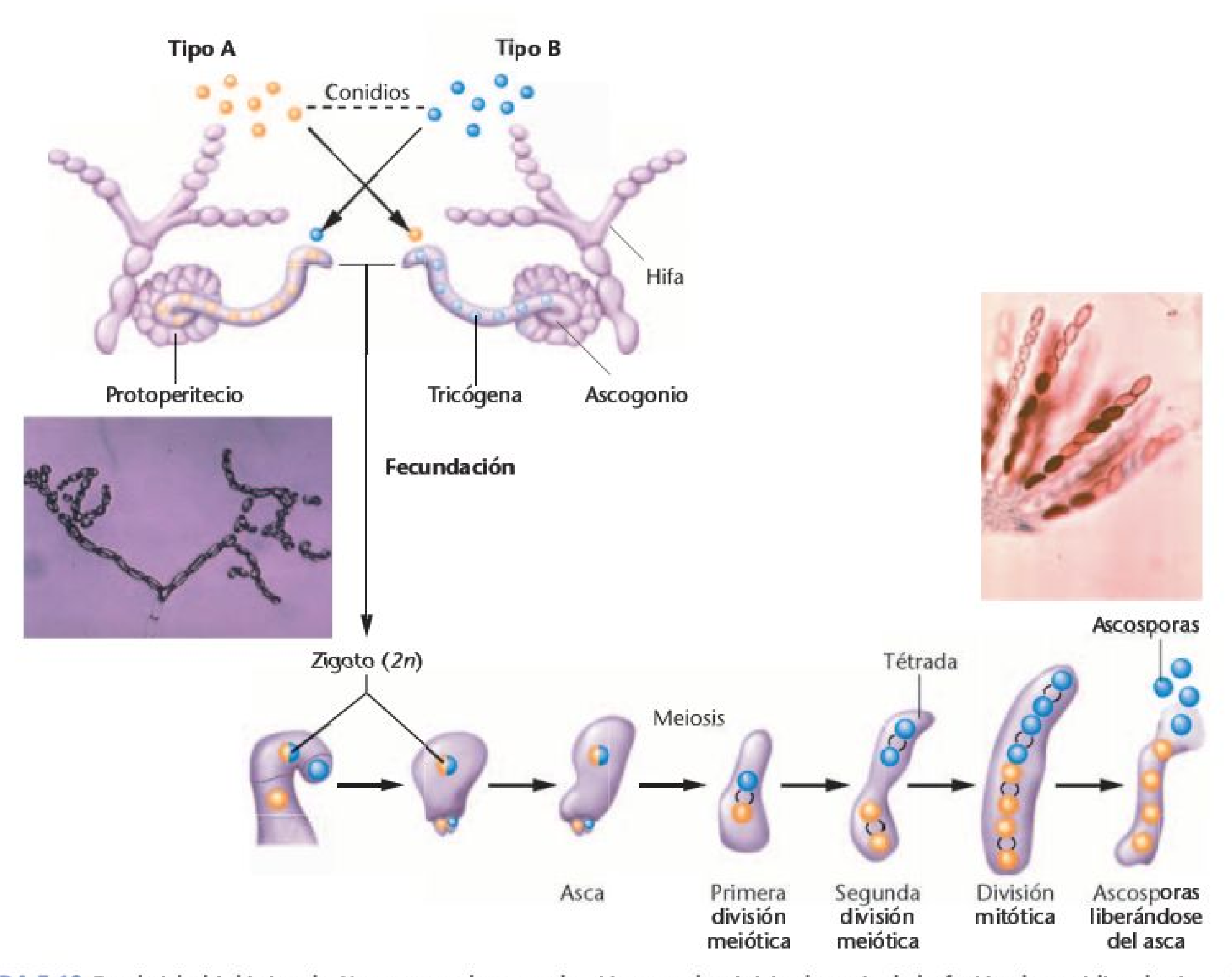


FIGURA 5.19 En el ciclo biológico de *Neurospora*, la reproducción sexual se inicia después de la fusión de conidios de tipos de apareamiento opuestos. Después de la fecundación, cada zigoto diploide queda encerrado en un asca, en donde se produce la meiosis, que da lugar a cuatro células haploides, dos de cada tipo de apareamiento. Luego se produce una división mitótica y posteriormente se liberan ocho ascosporas haploides. Después de la germinación, el ciclo se puede repetir. Las fotografías muestran los estados vegetativos del organismo y varias ascas que se pueden formar en una sola estructura, aun cuando hemos presentado lo que sucede en una sola asca.



Clase	Estudio de cuatro filamentos	Cromosomas después de la meiosis	Cromosomas después de la división mitótica	Ascosporas del asca
(a) Sin entrecruzamiento	a a + +	a a + +	a a a a + + + +	a a a a + + + +
		Segregación en la primera división		
(b) Una forma de entrecruzamiento en la fase de cuatro filamentos	a a + +	a + a +	a a + + a a + +	a a + + a a + +
		Segregación en la segunda división		
(c) Un entrecruzamiento alternativo en la fase de cuatro filamentos	a a + +	+ a a +	+ + a a a a + +	+ + a a a a + +
		Segregación en la segunda división		

FIGURA 5.20 En *Neurospora* se pueden producir patrones diferentes de ascosporas de tres formas distintas. El análisis de estos patrones puede servir de base para calcular la distancia entre el gen y el centrómero. La fotografía muestra una serie de disposiciones de ascosporas dentro de las ascas de *Neurospora*.

sión, ya que los dos alelos se separan en la primero división meiótica. Sin embargo, el entrecruzamiento alterará este patrón, como se muestra en las Figuras 5-20(b)(*aa*++*aa*++) y 5-20(c)(++*aaaa*++). También se pueden presentar otros dos patrones de recombinación, dependiendo de la orientación de las cromátidas en la segunda división meiótica: (++*aa*++*aa*) y (*aa*++++*aa*). Los cuatro patrones, que se producen por entrecruzamiento entre el gen *a* y el centrómero, reflejan la **segregación en la segunda división,** ya que los dos alelos no se separan hasta la segunda división meiótica. Ya que la división mitótica simplemente duplica los patrones (de 4 a 8 ascosporas), los datos de tétradas ordenadas normalmente se abrevian para reflejar los genotipos de los pares de ascosporas que se pueden distinguir unos de otros. Solo son posibles seis combinaciones:

	Segregación en la primera división			
(1)	a	a	+	+
(2)	+	+	a	a
	Segregación en la segunda división			
(3)	a	+	a	+
(4)	+	a	+	a
(5)	+	a	a	+
(6)	a	+	+	a

Para calcular la distancia entre el gen y el centrómero, los datos se tienen que obtener de un gran número de ascas en cruces controlados. Usando estos datos, se calcula la distancia (d):

$$d = \frac{\text{1/2 (ascas que segregan en la segunda división)}}{\text{total de ascas contadas}} \times 100$$

La distancia (d) refleja el porcentaje de recombinación y es sólo la mitad del número de ascas segregantes en la segunda división. Esto se debe a que el entrecruzamiento en cada una de ellas se ha dado en la meiosis sólo entre dos de las cuatro cromátidas.

Para poner un ejemplo, supongamos que a representa albino y + al tipo silvestre en *Neurospora*. En los cruces entre los dos tipos genéticos, suponga que se observaron los siguientes datos:

65 segregantes en la primera división
70 segregantes en la segunda división

Por ello, la distancia entre a y el centrómero es:

$$d = \frac{(1/2)\,(70)}{135} = 0{,}259 \times x\ 100 = 25{,}9$$

o alrededor de 26 um.

A medida que la distancia aumenta hasta 50 unidades, en teoría todas las ascas deberían resultar de la segregación en la segunda división. Sin embargo, hay numerosos factores que evitan esto. Como en los organismos diploides, la precisión es mayor cuando el gen y el centrómero están relativamente próximos. Como discutiremos en la sección siguiente, también podemos analizar los organismos haploides para distinguir entre ligamiento y transmisión independiente de dos genes. Las distancias de mapa entre loci génicos se calculan una vez que se ha comprobado el ligamiento. Por ello, ahora se disponen de mapas detallados de organismos como *Neurospora* y *Chlamydomonas*.

Análisis de tétradas ordenadas respecto de desordenadas

En la anterior discusión hemos supuesto que se puede determinar el genotipo de cada ascospora y su posición en la tétrada. Para realizar tal **análisis de tétradas ordenadas**, se debe diseccionar cada asca y cuando germine comprobar cada ascospora. Este es un proceso tedioso, pero es esencial para dos tipos de análisis:

1. Para distinguir entre la segregación de los alelos en la primera división meiótica y la segregación en la segunda división.
2. Para determinar si la recombinación es o no recíproca. En el primer caso, tal información es esencial «para cartografiar el centrómero», tal como acabamos de discutir. Por ello, debe realizarse el análisis de tétradas ordenadas a fin de averiguar la distancia entre el gen y el centrómero.

En el segundo caso, el análisis de tétradas ordenadas ha revelado que la recombinación no es siempre recíproca, particularmente cuando se estudian en *Ascomicetos* genes íntimamente ligados. Este hecho ha llevado a investigar el fenómeno llamado **conversión génica**. Debido a que su discusión requiere un conocimiento de la estructura y del análisis del DNA, volveremos a este tema en el Capítulo 11.

Es mucho menos tedioso aislar ascas, permitir que maduren y determinar los genotipos de cada ascospora, pero no en un orden concreto. Esto se denomina **análisis de tétradas desordenadas**. Como veremos en la sección siguiente, se puede usar tal análisis para determinar si dos genes están o no ligados en el mismo cromosoma y, si lo están, para determinar la distancia de mapa entre ellos.

Ligamiento y cartografía

El análisis de los datos genéticos derivados de organismos haploides se puede utilizar para distinguir entre ligamiento y transmisión independiente de dos genes; permite además calcular la distancia de mapa entre los loci una vez que se ha establecido el ligamiento. En la discusión siguiente consideraremos el análisis de las tétradas en el alga *Chlamydomonas*. Con la excepción de que los cuatro productos meióticos no están ordenados y de que *no* sufren división mitótica después de completar la meiosis, los principios generales discutidos para *Neurospora* también se aplican a *Chlamydomonas*.

Para comparar la transmisión independiente y el ligamiento, consideraremos dos alelos mutantes teóricos, a y b, que representan a dos loci distintos de *Chlamydomonas*. Supongamos que 100 tétradas derivadas del cruce $ab \times ++$ producen los datos de tétradas mostrados en la Tabla 5.1. Como se puede ver, todas las tétradas producen uno de los tres patrones. Por ejemplo, todas las tétradas de la clase I producen dos células ++ y dos células ab y se denominan **ditipos paternos (P)**. Las tétradas de la clase II producen células a+ y células +b y se denominan **ditipos no patrernos (NP)**. Las tétradas de la clase III producen una célula de cada unos de los cuatro genotipos posibles y por ello se denominan **tetratipos (T)**.

Estos datos apoyan la hipótesis de que los genes representados por los alelos a y b están localizados en cromosomas distintos. Para comprender porqué, debemos referirnos a la Figura 5.21. En las partes (a) y (b) de dicha figura, se demuestra

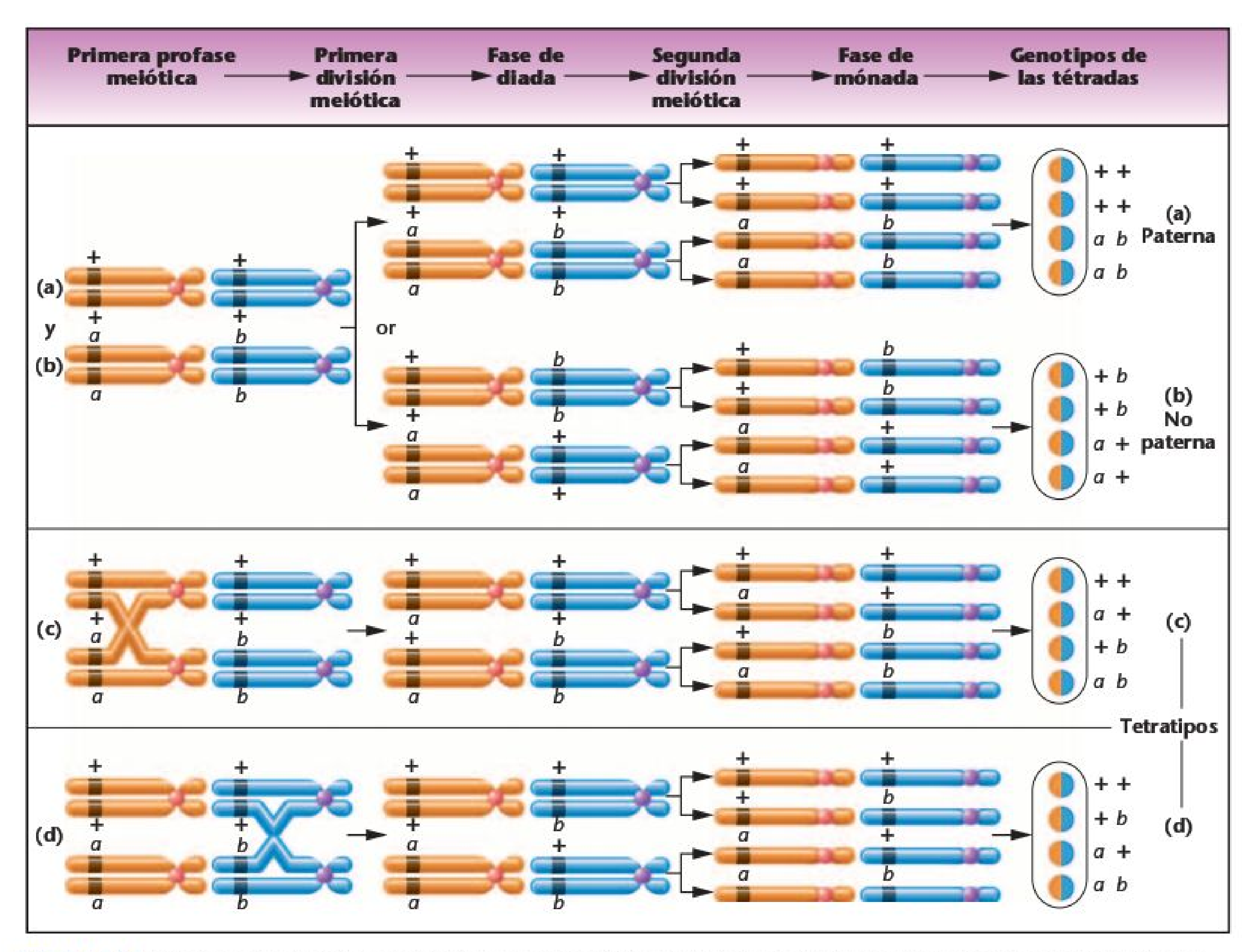


FIGURA 5.21 Origen de los distintos genotipos que se encuentran en tétradas de Chlamydomonas cuando se consideran dos genes localizados en cromosomas distintos.

el origen de los ditipos paternos (P) y no paternos (NP) para dos genes no ligados. De acuerdo con el principio mendeliano de la transmisión independiente de genes no ligados, se espera aproximadamente igual proporción de estos dos tipos de tétradas. Así, cuando hay igual número de ditipos paternos que de no paternos, los dos genes no están ligados. Los datos de la Tabla 5.1 confirman esta predicción. Debido a que se ha producido transmisión independiente, se puede concluir que los dos genes se encuentran en cromosomas distintos.

El origen de la clase III, los tetratipos, se esquematiza en la Figura 5.21 (c,d). Los genotipos de las tétradas de esta clase se pueden originar de dos formas posibles. Ambas implican un entrecruzamiento entre uno de los genes y el centrómero. En la Figura 5.21(c), el intercambio implica a uno de los dos cromosomas y ocurre entre el gen *a* y el centrómero; en la Figura 5.21(d) está implicado el otro cromosoma y el intercambio ocurre entre el gen *b* y el centrómero.

La producción de tetratipos no altera la proporción final de los cuatro genotipos presentes en todos los productos meióticos. Si se analizan los genotipos de 100 tétradas (que producen 400 células), se encuentran 100 de cada genotipo. Esta proporción 1:1:1:1 es la que se predice de acuerdo con la transmisión independiente esperada.

TABLA 5.1 **ANÁLISIS DE TÉTRADAS EN *CHLAMYDOMONAS***

Clase	I	II	III
Tipo de Tétrada	Paterna (P)	No paterna (NP)	Tetratipos (T)
Genotipos presentes	+ + + + *a b* *a b*	*a* + *a* + + *b* + *b*	+ + *a* + + *b* *a b*
Número de tétradas	43	43	14

Consideremos ahora el caso en el que los genes *a* y *b* están ligados (Figura 5.22). Se producirán las mismas clases de tétradas. Sin embargo, los ditipos paternos y no paternos no se darán necesariamente en la misma proporción; ni se encontrarán las cuatro combinaciones genotípicas en igual número si se analizan los genotipos de todos los productos meióticos. Por ejemplo, se podrían encontrar los siguientes datos:

Clase I	Clase II	Clase III
P	NP	T
64	6	30

Ya que las clases paternas y no paternas no se producen en igual proporción, podemos concluir que no hay transmisión independiente y que los dos loci están ligados. A continuación podemos seguir para determinar la distancia de mapa entre ellos.

En el análisis de estos datos, estamos interesados en la determinación de qué tipos de tétradas representan intercambios genéticos entre los dos genes. Las tétradas de los ditipos paternos (P) aparecen sólo cuando no hay entrecruzamiento entre los dos genes. Las tétradas de los ditipos no paternos (NP) aparecen sólo cuando hay un doble intercambio entre los dos genes, implicando a las cuatro cromátidas. Las tétradas tetratipo (T) surgen cuando hay un único entrecruzamiento o cuando ocurre un tipo alternativo de doble intercambio entre los dos genes. Los distintos tipos de intercambio descritos aquí se esquematizan en la Figura 5.22.

Cuando se ha determinado la proporción de estos tipos de tétradas, es posible calcular la distancia de mapa entre los dos genes ligados. La fórmula siguiente permite calcular la fre-

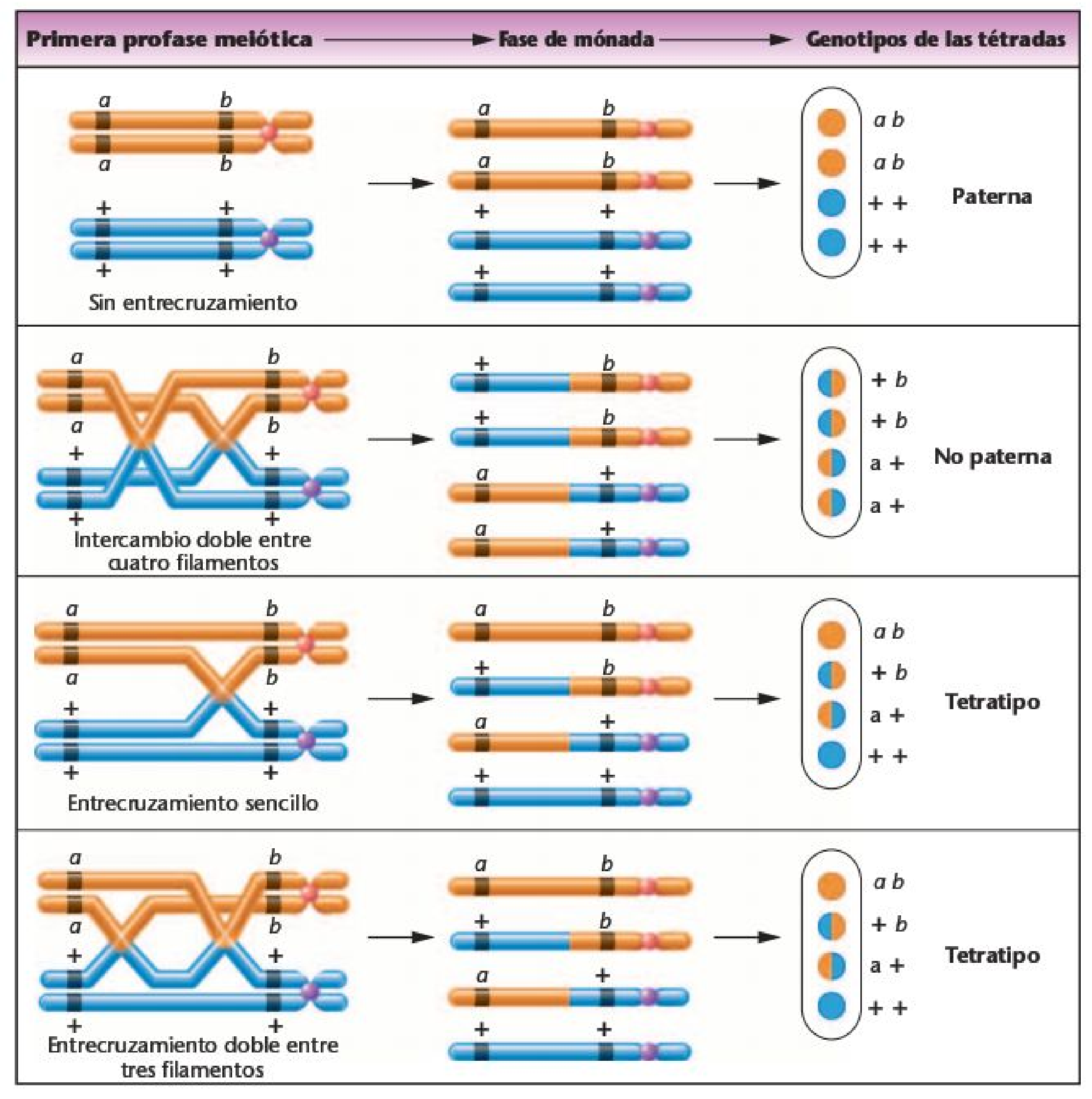


FIGURA 5.22 Distintos tipos de intercambio que dan lugar a los genotipos que se encuentran en las tétradas de *Chlamydomonas* cuando se consideran dos genes localizados en el mismo cromosoma.

cuencia del intercambio, que es proporcional a la distancia de mapa entre los dos genes:

$$\text{frecuencia de intercambio (\%)} = \frac{\text{NP} + 1/2(\text{T})}{\text{número total de tétradas}} \times 100$$

En esta fórmula, NP representa a las tétradas no paternos; todos los productos meióticos presentan un intercambio. Las tétradas tetratipo se representan por T; suponiendo sólo intercambios sencillos, la mitad de los productos meióticos presentan intercambios. La suma de las tétradas contabilizadas que pertenecen a estas categorías se divide entonces por el número total de tétradas examinadas (P + NP + T). Si este número se multiplica por 100, se convertirá en porcentaje, que equivale directamente a la distancia de mapa entre los genes.

En nuestro ejemplo, el cálculo revela que los genes *a* y *b* están separados por 21 um.

$$\frac{6 + 1/2(30)}{100} = \frac{6 + 15}{100} = \frac{21}{100} = 0{,}21 \times 100 = 21\%$$

Aunque hemos considerado el análisis del ligamiento y la construcción de un mapa de sólo dos genes al mismo tiempo, tales estudios implican a menudo a tres o más genes. En estos casos se puede determinar tanto la secuencia como la distancia de mapa de los genes.

5.11 El análisis de la puntuación *lod* y de la hibridación celular somática fueron históricamente importantes para confeccionar mapas de cromosomas humanos

Por razones obvias, nuestra propia especie no es una buena fuente de datos para los tipos de análisis amplios de ligamiento realizados con organismos experimentales. Por ello, en la especie humana los primeros estudios de ligamiento tuvieron que realizarse mediante el análisis de genealogías. Se hicieron intentos para establecer si un carácter estaba ligado al X o era autosómico. Como establecimos en el Capítulo 4, los caracteres determinados por genes localizados en el cromosoma X dan lugar a genealogías características; por ello fue fácil identificar tales genes. Para caracteres autosómicos, los genéticos intentaron distinguir claramente si pares de caracteres demostraban ligamiento o se transmitían independientemente. Cuando se dispone de extensas genealogías, es posible asegurar que los genes en consideración se encuentran íntimamente ligados (es decir, que raramente se separan por entrecruzamiento) por el hecho de que los dos caracteres segregan juntos. Por ejemplo, este planteamiento estableció el ligamiento entre los genes que codifican al **antígeno Rh** y al fenotipo denominado **eliptocitosis** (en donde la forma de los eritrocitos es oval).

Sin embargo, la dificultad surge cuando dos genes de interés están separados en un cromosoma de tal manera que se forman gametos recombinantes, oscureciendo el ligamiento en una genealogía. En tales casos, la demostración del ligamiento se mejora utilizando una técnica basada en cálculos probabilísticos, denominada el **método de la puntuación *lod*,** que ayuda a demostrar el ligamiento. Diseñado por J.B.S. Haldane y C.A. Smith en 1947 y mejorado por Newton Morton en 1955, la puntuación *lod* (del inglés «log *of the odss*», logaritmo de las probabilidades que favorecen el ligamiento) estima la probabilidad de que una genealogía dada, en la que se estudian dos caracteres, refleje ligamiento. Primero, se calcula la probabilidad de que los datos familiares (genealógicos), en relación con dos o más caracteres, concuerden con la transmisión independiente. Luego se calcula la probabilidad de que datos familiares idénticos para estos mismos caracteres resulten del ligamiento con una frecuencia de recombinación dada. La razón de estos valores de probabilidad expresa la «probabilidad» a favor o en contra del ligamiento. El método de la puntuación lod representó un avance importante para asignar genes humanos a cromosoma concretos y para construir mapas preliminares de cromosomas humanos. Sin embargo, su precisión viene limitada por la amplitud de la genealogía y los resultados iniciales fueron desalentadores debido a estas limitaciones y por el número haploide relativamente alto de cromosomas humanos (23). Hacia 1960, a parte de la asignación de algunos genes al cromosoma X, se disponía de muy poca información sobre el ligamiento autosómico o mapas.

En la década de 1960 se desarrolló una nueva técnica, la **hibridación celular somática,** que ayudó enormemente para asignar genes a sus respectivos cromosomas. Esta técnica, descubierta por Georges Barsky, se basa en el hecho de que se puede inducir que dos células de un cultivo de tejidos se fusionen, formando una célula híbrida. Barsky uso dos líneas celulares de ratón, pero pronto quedo claro que células de organismos diferentes también pueden fusionarse. Cuando ocurre esto, se produce un tipo celular denominado **heterocarión.** La célula híbrida tiene dos núcleos con un citoplasma común. Utilizando técnicas adecuadas es posible fusionar, por ejemplo, células humanas y de ratón, y separar a los híbridos de las células paternas.

Cuando se cultivan *in vitro* los heterocariones, ocurren dos cambios interesantes. Los núcleos acaban fusionándose, dando lugar a un **sincarión.** Luego, cuando se continúa el cultivo durante muchas generaciones, se van perdiendo gradualmente los cromosomas de una de las dos especies paternas. En el caso del híbrido hombre-ratón, los cromosomas humanos se pierden al azar hasta que, finalmente, el sincarion tiene una dotación completa de cromosomas de ratón y sólo unos pocos cromosomas humanos. Como veremos, es esta pérdida preferencial de cromosomas humanos, en lugar de los cromosomas de ratón, lo que hace posible la asignación de genes humanos a los cromosomas en los que se encuentran.

La lógica experimental es directa. Por ejemplo, si un producto génico humano concreto se sintetiza en un sincarión que tiene tres cromosomas humanos, entonces el gen responsable de dicho producto debe de encontrarse en uno de estos tres cromosomas que quedan en la célula híbrida. O si no se encuentra el producto génico humano, el gen responsable no puede estar presente en cualquiera de los tres cromosomas humanos que quedan. Idealmente, un panel de 23 líneas celulares híbridas, cada una con un único cromosoma humano, permitiría la asignación inmediata de cualquier gen humano a un cromosoma concreto para el que pudiera caracterizarse el producto.

En la práctica, lo que se utiliza más a menudo es un panel de líneas celulares, cada una con varios cromosomas humanos. La correlación entre la presencia o ausencia de cada cromosoma con la presencia o ausencia de cada producto génico se denomina **prueba de sintenia.** Considere, por ejemplo, los datos hipotéticos proporcionados en la Figura 5.23, en donde cuatro productos génicos (*A, B, C* y *D*) se comprueban en relación con ocho cromosomas humanos. Analicemos cuidadosamente el gen que produce el producto *A*:

1. El producto *A* no se produce en la línea celular 23, y en dicha línea están presentes los cromosomas 1, 2, 3 y 4. Por consiguiente, podemos excluir la presencia del gen *A* en dichos cuatro cromosomas y concluir que debe de estar en los cromosomas 5, 6, 7 u 8.
2. El producto *A* se produce en la línea celular 34, en la que se encuentran los cromosomas 5 y 6, pero no el 7 y el 8. Por consiguiente el gen *A* tiene que estar en los cromosomas 5 ó 6, pero no en el 7 u 8 porque no se encuentran aun cuando se produce el producto A.
3. El producto *A* también se produce en la línea celular 41, en la que se encuentra el cromosoma 5, pero no el 6. Por consiguiente, de acuerdo con este análisis, el gen *A* está en el cromosoma 5.

Utilizando una lógica similar, el gen *B* se puede asignar al cromosoma 3. Podría realizar dicho análisis para demostrarse a sí mismo que es correcto.

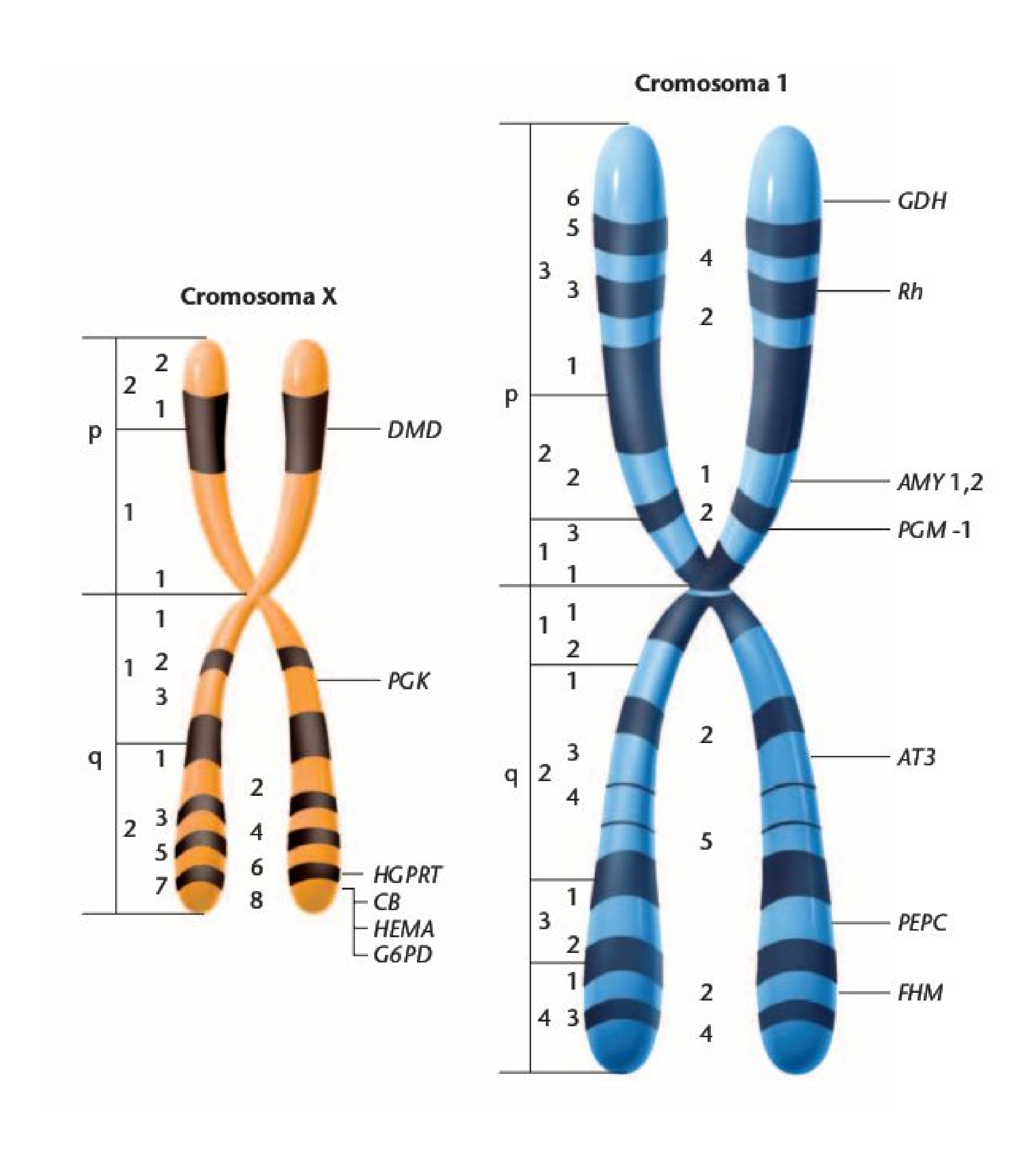
El gen *C* presenta una situación especial. Los datos indican que no está en ninguno de los siete primeros cromosomas (1-7), ya que no se produce en ninguna de estas tres líneas celulares que en conjunto tienen dichos cromosomas. Aunque podría estar en el cromosoma 8, no hay ninguna prueba directa que apoye esta conclusión. Se necesitan otros paneles. Le dejamos el gen *D* para su análisis. ¿En qué cromosoma se encuentra?

Utilizando el método descrito anteriormente, se asignaron a cromosomas concretos literalmente cientos de genes humanos. En la Figura 5.24 se indican algunas localizaciones de genes en dos cromosomas humanos: X y 1. La localización de los genes que se muestran se dedujo o se confirmó mediante la técnica de la hibridación celular somática. Para cartografiar genes cuyos productos no se conocen todavía, los investigadores han tenido que confiar en otros enfoques. Por ejemplo, fue posible asignar los genes responsables de la enfermedad de Huntingtton, de la fibrosis quística y de la neurofribromatosis a sus respectivos cromosomas 4, 7 y 17, combinando la tecnología del DNA recombinante con el análisis de genealogías.

Concluimos esta discusión hablando del siguiente paso en la cartografía de genes humanos: la asignación de genes a diferentes regiones de un cromosoma dado. A veces, en líneas celulares híbridas, fragmentos de un cromosoma dado se transfieren a otro cromosoma, dando lugar a una **translocación.** Utilizando la técnica de bandeo cromosómico, es posible identificar el origen exacto de la translocación y correlacionar la presencia de un segmento cromosómico en las células híbridas con una expresión génica específica. De esta manera se pueden compilar mapas génicos de cromosomas humanos. En la Figura 5.24 se presentan mapas parciales que ilustran este punto. Aunque los mapas de cromosomas humanos no son tan específicos como los mapas genéticos de *Drosophila,* estos primeros estudios proporcionaron mucha información sobre la localización cromosómica de multitud de genes humanos. Como veremos, la moderna tecnología que implica al DNA recombinante y al Proyecto Genoma Humano ha ampliado mucho nuestro conocimiento sobre la localización de genes en el genoma humano.

Líneas celulares híbridas	Cromosomas humanos presentes								Productos génicos que se expresan			
	1	2	3	4	5	6	7	8	A	B	C	D
23	▬	▬	▬	▬					−	+	−	+
34	▬	▬			▬	▬			+	−	−	+
41	▬		▬		▬		▬		+	+	−	+

FIGURA 5.23 Parrilla de datos hipotéticos utilizada en una prueba de sintenia para asignar genes a sus correspondientes cromosomas humanos. Se comprueba en tres líneas celulares híbridas somáticas, denominadas 23, 34 y 41, la presencia o ausencia de los cromosomas humanos del 1 al 8, así como su capacidad para producir los productos génicos hipotéticos humanos *A, B, C* y *D*.



Clave		
	AMY	Amilasa (salival y pancreática)
	AT3	Antitrombina (factor de coagulación IV)
	CB	Ceguera para los colores
	DMD	Distrofia muscular de Duchenne
	FHM	Fumarato hidratasa (mitocondrial)
	GDH	Glucosa deshidrogenasa
	G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
	HEMA	Hemofilia A (clásica)
	HGPRT	Hipoxantin-guanosín-fosforibosil transferasa (síndrome de Lesch-Nyhan9
	PEPC	Peptidasa C
	PGK	Fosfoglicerato quinasa
	PGM	Fosfoglucomutasa
	Rh	Grupo sanguíneo Rhesus (eritroblastosis fetal)

FIGURA 5.24 Representación de la asignación y situación de genes en los cromosomas humanos 1 y X. Muchas de las asignaciones se realizaron inicialmente utilizando técnicas de hibridación celular somática.

5.12 Ahora es posible la cartografía de genes utilizando el análisis molecular del DNA

Mientras que los métodos tradicionales basados en el análisis de la recombinación han dado lugar a mapas génicos detallados en varios organismos, la realización de mapas génicos en otros organismos que no se prestan a tales estudios, incluido los humanos, está muy limitado. Afortunadamente, el desarrollo de tecnologías que permiten el análisis directo del DNA ha mejorado mucho la cartografía de genes en tales organismos. Hablaremos de este tema utilizando a la especie humana como ejemplo.

El progreso ha contado inicialmente con el descubrimiento de **marcadores del DNA** que se han identificado en estudios genómicos y de DNA recombinante. Estos marcadores se pueden rastrear en genealogías multigeneracionales en donde pueden situarse en cromosomas concretos. Luego, los genes humanos se pueden analizar en relación con estos marcadores estableciendo su posición a lo largo de los cromosomas, dando lugar a mapas genéticos más detallados. Por ejemplo, se puede determinar la localización de marcadores del DNA denominados **microsatélites, minisatélites y polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)** (véase el Capítulo 12). Luego un gen, como el implicado en la fibrosis quística, se puede localizar en relación con tales marcadores utilizando las técnicas del **paseo cromosómico** o del **salto cromosómico** (Capítulo 19).

La fibrosis quística es una anomalía exocrina recesiva autosómica que se produce por secreción excesiva de mucus espeso que impide la función de órganos como los pulmones y el páncreas. Primero se estableció que el gen causante de este trastorno estaba localizado en el cromosoma 7. Posteriormente, utilizando las técnicas del paseo cromosómico, se determinó su posición exacta en el brazo largo del cromosoma. Utilizando este enfoque, se ha podido disponer de mapas de genes humanos mucho más detallados.

Cartografía de genes utilizando las anotaciones de las bases de datos

Como veremos más tarde en el texto (Capítulos 19 y 20), la tecnología actual en relación con el Proyecto Genoma Humano ha tenido un impacto incluso más profundo en el conocimiento de la localización de genes en el genoma humano (y en otros genomas animales y vegetales). El primer objetivo del Proyecto Genoma Humano fue obtener la secuencia del genoma humano y luego, mediante análisis computacional, determinar la localización de los genes. En la actualidad se dispone de estos datos en varios lugares de la RED y son fácilmente accesibles mediante técnicas de búsqueda sencillas.

Un resultado de los muchos proyectos de bases de datos completados es que es ahora posible determinar la localización exacta de cualquier gen en un cromosoma en distancia de pares de bases en lugar de en frecuencias de recombinación. Esto, que se denomina **mapa físico** del genoma, se distingue de los mapas genéticos descritos anteriormente. Luego se pueden determinar las distancias relativas respecto de otros genes y de elementos como los mini- y microsatélites así como de marcadores denominados como **polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).** La potencia de este planteamiento es que pronto será posible construir mapas de cromosomas para individuos que indiquen las combinaciones alélicas específicas en cada lugar génico.

5.13 ¿Encontró Mendel ligamiento?

Concluimos este capítulo examinando una interpretación puesta al día de los experimentos que sirvieron de piedra angular de la transmisión genética: los cruces con el guisante de jardín realizados por Mendel. Algunos estudiosos creen que Mendel tuvo mucha fortuna en sus clásicos experimentos con el guisante de jardín. En ninguno de sus cruces encontró relaciones de ligamiento *aparentes* entre ninguno de los siete caracteres mutantes. Si hubiera obtenido Mendel datos muy variables, característicos del ligamiento y entrecruzamiento, estos datos no ortodoxos podrían haber ocultado su exitoso análisis e interpretación.

El artículo de Stig Blixt, reimpreso en su totalidad, presenta una interpretación puesta al día de los experimentos de Mendel, demostrando lo inadecuado de esta hipótesis. Como veremos, algunos de los genes de Mendel estaban realmente ligados. Dejemos que Stig Blixt le aclare porqué Mendel no detectó ligamiento.

¿Por qué Gregor Mendel no encontró ligamiento?

Se dice a menudo que Mendel fue muy afortunado en no entrar en las complicaciones del ligamiento en sus experimentos. Utilizó siete genes y el guisante tiene sólo siete cromosomas. Se ha dicho que si hubiera analizado uno mas, hubiera tenido problemas. Sin embargo, esto es una burda simplificación. La situación real fue, muy probablemente, que Mendel trabajó con tres genes situados en el cromosoma 4, dos genes en el cromosoma 1 y un gen en los cromosomas 5 y 7. (Véase la Tabla 1.) A primera vista parece que, de las 21 combinaciones dihíbridas posibles que Mendel podría haber estudiado teóricamente, al menos cuatro (es decir, a-i, v-fa, v-le y fa-le) tendrían que haber dado resultados de ligamiento. Sin embargo, tal como se encuentra en cientos de cruces y de acuerdo con el mapa genético del guisante, a e i del cromosoma 1 se encuentran localizados tan lejos que normalmente no se detecta ligamiento. Lo mismo ocurre para v y le por un lado, y para fa por otro, del cromosoma 4. Esto deja a v-le, que tendría que haber presentado ligamiento.

Sin embargo, parece que Mendel no publicó esta combinación concreta y por ello, probablemente, nunca hizo el cruce apropiado para obtener la segregación de ambos genes simultáneamente. Por consiguiente no es tan sorprendente que Mendel no entrara en la complicación del ligamiento, aunque no lo evitó eligiendo un gen de cada cromosoma.

Stig Blixt
Weibullsholm Plant Breeding Institute, Landskrona, Suecia, y Centro de Energía Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, Brazil.

TABLA 1 RELACIONES ENTRE LA TERMINOLOGÍA GENÉTICA ACTUAL Y LOS PARES DE CARACTERES UTILIZADOS POR MENDEL

Par de caracteres utilizados por Mendel	Alelos en la terminología actual	Localizados en el cromosoma
Color de la semilla, amarillo-verde	*I–i*	1
Cubierta de la semilla y flores, coloreadas-blancas	*A–a*	1
Vainas maduras, hinchadas lisas-arrugadas	*V–v*	4
Inflorescencias, en el eje de las hojas-umbeladas en la parte superior de la planta	*Fa–fa*	4
Altura de la planta, 0,5–1 m	*Le–le*	4
Vainas no maduras, verdes-amarillas	*Gp–gp*	5
Semillas maduras, lisas-rugosas	*R–r*	7

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Se dice que los genes localizados en el mismo cromosoma están ligados. Por consiguiente, los alelos localizados en el mismo homólogo se pueden transmitir juntos en la formación de los gametos. Sin embargo, el entrecruzamiento entre homólogos en la meiosis da lugar a una mezcla de alelos, contribuyendo con ello a la variabilidad genética de los gametos.
2. Al principio del siglo XX, los genéticos constataron que el entrecruzamiento podía proporcionar la base experimental para cartografiar la localización de los genes ligados a lo largo del cromosoma.
3. La interferencia es un fenómeno que describe el grado en que un entrecruzamiento en una región de un cromosoma influye en que se produzca un entrecruzamiento en una región adyacente. El coeficiente de coincidencia (C) es una estimación cuantitativa de la interferencia, que se calcula dividiendo los doble recombinantes observados por los doble recombinantes esperados.
4. Debido a las consideraciones estadísticas descritas por la distribución de Poisson, cuando la distancia real entre dos genes aumenta, la distancia de mapa determinada experimentalmente es cada vez más impreciso (subestimada).
5. En organismos como el maíz, los ratones o *Drosophila*, se han confeccionado detallados mapas genéticos
6. Investigaciones citológicas, tanto en el maíz como en Drosophila, han revelado que el entrecruzamiento implica un intercambio físico de segmentos entre cromátidas no hermanas.
7. En unos pocos organismos, como Drosophila y Aspergillus, en la mitosis se produce emparejamiento entre homólogos y entrecruzamiento entre ellos en una frecuencia mucho menor que en la meiosis.
8. En la mitosis también puede ocurrir intercambio de material genético entre cromátidas hermanas (ICH). Una elevada frecuencia de tales intercambios se observan en la enfermedad denominada síndrome de Bloom.
9. En eucariotas haploides es posible realizar análisis de ligamiento y mapas de cromosomas. Nuestra discusión ha incluido la cartografía de gen a centrómero y de gen a gen, así como la consideración de cómo se distingue entre ligamiento y transmisión independiente.
10. Las técnicas de hibridación de células somáticas han hecho posible el análisis de ligamiento y los mapas de genes humanos.
11. Hay pruebas de que algunos de los siete caracteres utilizados por Mendel se encuentran de hecho ligados. Sin embargo, en tales casos, los genes están lo suficientemente alejados como para impedir la detección del ligamiento.

Ideas y soluciones

1. En una serie de cruces para un mapa de dos puntos, en el que estaban implicados tres genes ligados en el cromosoma 3 de *Drosophila*, se calcularon las siguientes distancias.:

cd–sr 13 um

cd–ro 16 um

(a) Determine la secuencia y construya un mapa para estos tres genes.

Solución: Es imposible hacerlo; hay dos posibilidades basadas en estos escasos datos,

Caso 1: *cd* —13— *sr* —3— *ro*

o

Caso 2: *ro* —16— *cd* —13— *sr*

(b) ¿Qué datos del mapa resolverían este caso?

Solución: La distancia de mapa determinada por el entrecruzamiento entre *ro* y *sr*. Si el caso 1 es correcto, debería ser 3 um, y si el Caso 2 es correcto, 29 um. De hecho esta distancia es 29 um, demostrándose que el Caso 2 es el correcto.

(c) ¿Puede decir cuál de las secuencias mostradas anteriormente es la correcta?

ro —16— *cd* —13— *sr*

o

sr —13— *cd* —16— *ro*

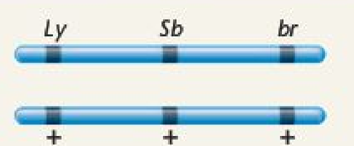
Solución: No; basándonos en los datos del mapa, son equivalentes.

2. En *Drosophila*, las mutaciones *Lyra (Ly)* y *Stubble (Sb)* son dominantes y localizadas en los loci 40 y 58, respectivamente, del cromosoma 3. Se descubrió una mutación recesiva con ojos rojo brillante, localizada también en el cromosoma 3. Se obtuvo un mapa cruzando una hembra que era heterozigota para las tres mutaciones con un macho homozigoto para la mutación de ojos rojos (que denominaremos aquí como *br*). Se obtuvieron los siguientes datos:

Fenotipo				Número
(1)	*Ly*	*Sb*	*br*	404
(2)	+	+	+	422
(3)	*Ly*	+	+	18
(4)	+	*Sb*	*br*	16
(5)	*Ly*	+	*br*	75
(6)	+	*Sb*	+	59
(7)	*Ly*	*Sb*	+	4
(8)	+	+	*br*	2
				Total = 1.000

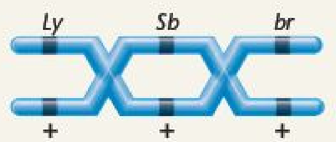
Determine la situación de la mutación *br* en el cromosoma 3. Refiriéndose a la Figura 5.14, prediga qué mutación se habría descubierto. ¿Cómo puede estar seguro?

Solución: Determine primero la *situación* de los alelos en los homólogos de los padres recombinantes heterozigotos (la hembra en este caso) localizando los fenotipos recíprocos más frecuentes, que corresponden a los gametos no recombinantes. Son los fenotipos (1) y (2). Cada uno representa la situación de los alelos en cada homólogo. Por consiguiente, la situación es

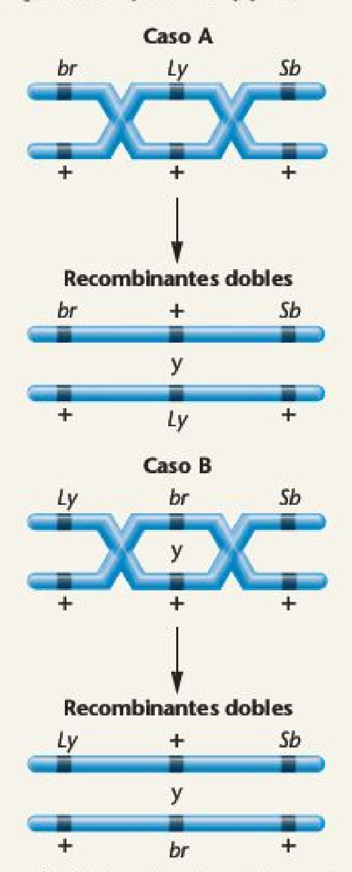


Segundo, averigüe la secuencia correcta de los tres loci a lo largo del cromosoma, determinando qué secuencia producirá los doble recombinantes observados, que son los fenotipos recíprocos menos frecuentes (7 y 8).

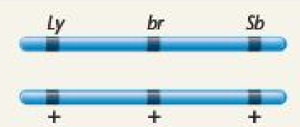
Si la secuencia es correcta, entonces la doble recombinación dibujada aquí,



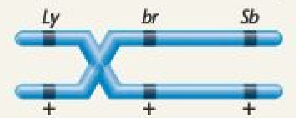
dará lugar a los fenotipos *Ly* + *br* y + *Sb* +. La inspección demuestra que estas clases (5 y 6) son realmente recombinantes sencillos, no recombinantes dobles. Por consiguiente, la secuencia, tal como se ha escrito, es incorrecta. Sólo hay otras dos posibles secuencias. El gen *br* está bien a la izquierda de *Ly*, o entre *Ly* y *Sb*.



La comparación con los datos reales demuestra que el caso B es el correcto. Los gametos doble recombinantes (7) y (8) producen moscas que expresan *Ly* y *Sb*, pero no *br*, o que expresan *br*, pero no *Ly* y *Sb*. Por consiguiente, la situación y la secuencia correctas son como sigue:



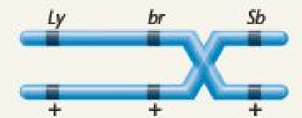
Una vez que se han establecido la situación y la secuencia correctas, es posible determinar la localización de *br* en relación con *Ly* y *Sb*. Una recombinación entre *Ly* y *br*, como se muestra aquí



da lugar a moscar que son *Ly* + + y + *br Sb* (clases 3 y 4). Por consiguiente, la distancia entre los loci *Ly* y *br* les

$$\frac{18 + 16 + 4 + 2}{1{,}000} = \frac{40}{1{,}000} = 0{,}04 = 4 \text{ um}$$

Recuerde que, debido a que necesitamos saber la frecuencia de todos los recombinantes entre *Ly* y *br*, tenemos que sumar los dobles recombinantes, ya que representan dos recombinaciones sencillas que ocurren simultáneamente. De igual manera, la distancia entre los loci *br* y *Sb* deriva principalmente de las recombinaciones sencillas entre ellos.



Esto da lugar a fenotipos *Ly br* + y ++ *Sb* (clases 5 y 6). Por consiguiente la distancia es

$$75 + 59 + 4 + 2/1{,}000 = 140/1{,}000 = 0{,}14 = 14 \text{ um}$$

El mapa completo muestra que *br* está localizado en el locus 44, ya que se conocen *Lyra* y *Stubble*:

40 ——(4)—— 44 ————(14)———— 58

Ly *br* *Sb*

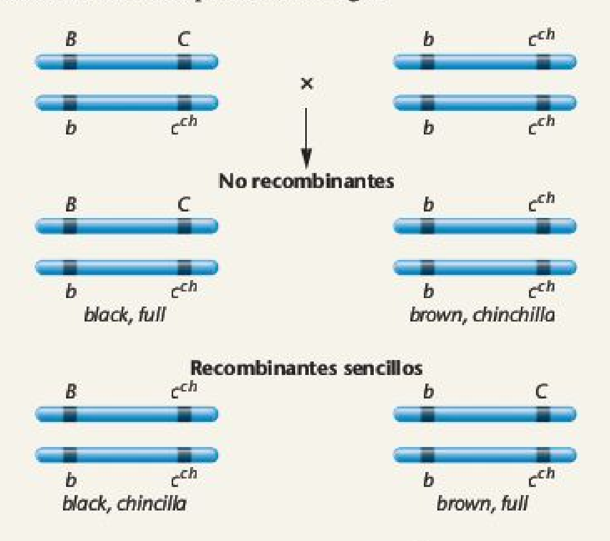
La inspección de la Figura 5.14 revela que la mutación *scarlet*, que da lugar a ojos rojo brillante, está en el locus 44, por lo que es razonable suponer que la mutación de ojos rojo brillante sea un alelo de *scarlet*. Para comprobar esta hipótesis, cruzaríamos hembras de nuestro mutante rojo brillante con machos *scarlet*. Si las dos mutaciones son alélicas, no habrá complementación y toda la descendencia tendrá ojos de fenotipo rojo brillante. Si hay complementación, toda la descendencia tendrá ojos normales de color rojo ladrillo (tipo silvestre), ya que la mutación de ojos rojo brillante y *scarlet* estarán en locus distintos. (Probablemente muy próximos.) En tal caso, toda la descendencia será heterozigota para ambos loci y no expresarán ninguna mutación, ya que las dos son recesivas. Este cruce representa lo que se llama una **prueba de alelismo.**

3. En los conejos, *black* (*B*) es dominante sobre *brown* (*b*), mientras que *full color* (*C*) es dominante sobre *chinchilla* (c^{ch}). Los genes que controlan estos caracteres están ligados. Se cruzaron conejos que eran heterozigotos para ambos caracteres y expresaban *black* y *full color*, con conejos *brown, chinchilla*, con los siguientes resultados:

31 *brown, chinchilla*
34 *black, full color*
16 *brown, full color*
19 *black, chinchilla*

Determine la situación de los alelos en los padres y la distancia de mapa entre los dos genes.

Solución: Éste es un problema de mapa de dos puntos, en donde se reconocen los dos fenotipos recíprocos no recombinantes por estar en mayor número (*brown, chinchilla* y *black, full color*). Los fenotipos recíprocos menos frecuentes (*brown, full color* y *black, chinchilla*) aparecen por un entrecruzamiento sencillo. La situación de los alelos se deduce de los fenotipos no recombinantes, ya que reciben gametos intactos. El cruce se representa como sigue:



Los entrecruzamientos sencillos dan lugar a 35/100 descendientes (35 por ciento). Por consiguiente la distancia entre los dos genes es de 35 um.

4. En un cruce en *Neurospora* en donde un padre expresaba el alelo mutante *a* y el otro el fenotipo silvestre (+), se obtuvieron los siguientes datos en el análisis de las ascosporas:

Secuencia de las ascosporas en el asca	Tipos de Ascas 1	2	3	4	5	6	
	+	a	a	+	a	+	
	+	a	a	+	a	+	
	+	a	+	a	+	a	
	+	a	+	a	+	a	
	a	+	a	+	+	a	
	a	+	a	+	+	a	
	a	+	+	a	a	+	
	a	+	+	a	a	+	
	39	33	5	4	9	10	Total = 100

Calcular la diferencia entre el gen y el centrómero.

Solución: Las ascas de tipo 1 y 2 representan a segregantes en la primera división (spd) en donde no se ha producido entrecruzamiento entre el locus *a* y el centrómero. Las demás (3-6) representan la segregación en la segunda división (ssd). Aplicando la fórmula

$$\text{distancia} = \frac{1/2 \text{ ssd}}{\text{ascas totales}}$$

obtenemos el siguiente resultado:

$$\begin{aligned} d &= 1/2\,(5 + 4 + 9 + 10)/100 \\ &= 1/2\,(28)/100 \\ &= 0{,}14 \\ &= 14\ um \end{aligned}$$

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. ¿Cuál es el significado de la recombinación en el proceso evolutivo?
2. Describa la observación citológica que sugiere que el entrecruzamiento se produce en la primera profase de la meiosis.
3. ¿Por qué se producen más entrecruzamientos entre dos genes ligados alejados que entre dos genes que están muy juntos en el cromosoma?
4. ¿Por qué el límite superior de la recuperación de productos con un entrecruzamiento es del 50 por ciento, incluso aunque *siempre* haya entrecruzamiento entre dos genes ligados?
5. ¿Por qué se espera que una doble recombinación sea menos frecuente que una recombinación sencilla?
6. ¿Cuáles son las bases para la interferencia positiva?
7. ¿Qué dos criterios esenciales deben cumplirse a fin de realizar con éxito un cruce para obtener un mapa?
8. Los genes *dumpy* (*dp*), *clot* (*cl*), y *apterous* (*ap*) están ligados en el cromosoma 2 de *Drosophila*. En una serie de cruces para mapas de dos puntos, se determinaron las siguientes distancias genéticas:

dp − *ap*	42
dp − *cl*	3
ap − *cl*	39

¿Cuál es la secuencia de estos tres genes?

9. Considere dos hipotéticos genes autosómicos recesivos *a* y *b*. Cuando se realiza un cruce prueba entre un heterozigoto y un doble homozigoto mutante, prediga las proporciones fenotípicas en las siguientes condiciones:
   (a) *a* y *b* se localizan en autosomas distintos.
   (b) *a* y *b* están ligados en el mismo autosoma, pero están tan alejados que siempre se produce un entrecruzamiento entre ellos.
   (c) *a* y *b* están ligados en el mismo autosoma, pero están tan próximos que casi nunca se produce un entrecruzamiento entre ellos.
   (d) *a* y *b* están ligados en el mismo autosoma, a una distancia de unas 10 um.
10. En el maíz, la aleurona coloreada (en los granos) se debe al alelo dominante *R*. El alelo recesivo *r* produce, en homozigosis, aleurona incolora. El color de la planta (no de los granos) esta controlado por otro gen con dos alelos, *Y* e *y*. El alelo dominante *Y* da lugar a color verde, mientras que la presencia en homozigosis del alelo recesivo *y* da lugar a que la planta sea amarilla. En un cruce prueba entre una planta de genotipo y fenotipo desconocidos y una planta homozigota recesiva para ambos caracteres, se obtuvo la siguiente descendencia:

Coloreados verde	88
Coloreados amarilla	12
Incoloros verde	8
Incoloros amarilla	92

Explique cómo se obtuvieron estos resultados para determinar el genotipo y fenotipo exactos de la planta desconocida, incluyendo la asociación de los dos genes en los homólogos (es decir, su situación).

11. En el cruce que se presenta aquí, que se refiere a dos genes ligados, *ebony* (*e*) y *claret* (*ca*) de *Drosophila*, en donde no hay entrecruzamiento en los machos, se obtuvieron descendientes en la proporción fenotípica 2 + :1 *ca*:1 *e*:

♀		♂
$\frac{e \quad ca^+}{e^+ \quad ca}$	×	$\frac{e \quad ca^+}{e^+ \quad ca}$

Estos genes se encuentran alejados 30 um en el cromosoma 3. ¿Cuál es la contribución del entrecruzamiento en las hembras para producir estos fenotipos?

12. Con dos pares de genes implicados (P/p y Z/z), un cruce prueba (*ppzz*) con un organismo de genotipo desconocido dio lugar a las siguientes proporciones de gametos:

PZ, 42,4 por ciento; *Pz*, 6,9 por ciento; *pZ*, 7,1 por ciento; y *pz*, 43,6 por ciento

Deduzca todas las posibles conclusiones de estos datos.

13. En una serie de cruces para mapas de dos puntos relativos a cinco genes localizados en el cromosoma II de *Drosophila*, se observaron las siguientes frecuencias recombinantes (entrecruzamientos sencillos):

pr–adp	29
pr–vg	13
pr–c	21
pr–b	6
adp–b	35
adp–c	8
adp–vg	16
vg–b	19
vg–c	8
c–b	27

   (a) Si el gen *adp* se encuentra cerca del extremo del cromosoma II (locus 83), construya un mapa para estos genes.
   (b) En otra serie de experimentos se comprobó, un sexto gen, el *d*, respecto de *b* y *pr*:

d–b	17 por ciento
d–pr	23 por ciento

Prediga los resultados de mapas de dos puntos entre *d* y *c*, *d* y *vg*, y *d* y *adp*.

14. Se aislaron dos hembras distintas de *Drosophila*, ambas heterozigotas para los genes autosómicos ligados *b* (*blak body*), *d* (*dacha tarsos*) y *v* (*curved wings*). Estos genes se encuentran en el orden *d-b-c*, estando *b* más cercano a *d* que a *c*. Se presenta la situación de los genes en cada hembra, junto con los distintos gametos producidos por ambas:

Hembra A		Hembra B	
$\frac{d \ b \ +}{+ \ + \ c}$		$\frac{d \ + \ +}{+ \ b \ c}$	
↓	Formación de gametos	↓	
(1) *d b c*	(5) *d*++	(1) d b +	(5) *d b c*
(2) + + +	(6) + *b c*	(2) + + *c*	(6) + + +
(3) + + *c*	(7) *d* + *c*	(3) *d* + *c*	(7) *d* + +
(4) *d b* +	(8) + *b* +	(4) + *b* +	(8) + *b c*

Identifique qué clases son no recombinates (NR), recombinantes sencillos (RS) y recombinantes dobles (DR) en cada caso. Luego indique la frecuencia relativa en la que se producirá cada uno.

15. En *Drosophila*, se realizó un cruce entre hembras que expresaban los tres caracteres recesivos ligados al X, quetas *scute (sc)*, cuerpo *sable (s)* y ojos *vermilion (v)* con machos de tipos silvestre. En la F_1 todas las hembras eran de tipo silvestre, mientras que todos los machos expresaban los tres caracteres mutantes. Los cruces se llevaron hasta la generación F_2 y se contaron 1.000 descendientes, con los resultados que se muestran a continuación:

Fenotipo	Descendientes
sc s v	314
+ + +	280
+ *s v*	150
sc + +	156
sc + *v*	46
+ *s* +	30
sc s +	10
+ + *v*	14

No se determinó el sexo en los descendientes.

(a) Utilizando la nomenclatura adecuada, determine los genotipos de los padres P_1 y F_1.

(b) Determine la secuencia de los tres genes y sus distancias de mapa.

(c) ¿Hay más o menos dobles entrecruzamientos de los esperados? Calcule el coeficiente de coincidencia. ¿Hay interferencia positiva o negativa?

16. Otro cruce en *Drosophila*, implicaba a los genes recesivos ligados al X *yellow (y)*, *white (w)* y *cut (ct)*. Una hembra con ojos blancos, cuerpo amarillo y alas normales se cruzó con un macho de cuerpo y ojos normales, pero con alas recortadas. Las hembras de F_1 fueron silvestres para los tres caracteres, mientras que los machos tenían cuerpo amarillo y ojos blancos. Se hizo un cruce para obtener la F_2, en donde solo se tuvo en cuenta a los machos. De acuerdo con los datos mostrados aquí, construya un mapa genético:

Fenotipo	Descendencia masculina
y + *ct*	9
+ *w* +	6
y w ct	90
+ + +	95
+ + *ct*	424
y w +	376
y + +	0
+ *w ct*	0

(a) Indique los genotipos de los padres de F_1.

(b) Asumiendo que *white* está en el locus 1,5 del cromosoma X, construya el mapa.

(c) ¿Por qué no se han encontrado descendientes doble recombinantes?

(d) ¿Podrían utilizarse para contruir el mapa las hembras descendientes F_2? ¿Por qué sí o por qué no?

17. En *Drosophila*, la mutación *Dichaete (D)* se encuentra en el cromosoma 3 y tiene un efecto dominante sobre la forma del ala. Es letal en homozigosis. Los genes *ebony (e)* y *pink (p)* son mutaciones recesivas del cromosoma 3 y afectan al color del cuerpo y de los ojos, respectivamente. Se cruzaron moscas de una cepa *Dichaete* con moscas homozigotas *ebony* y *pink*, y la F_1, con fenotipo *Dichaete*, se retrocruzó con homozigotos *ebony* y *pink*. El resultado de este cruce retrógrado fue el siguiente:

Fenotipo	Número
Dichaete	401
ebony, pink	389
Dichaete, ebony	84
pink	96
Dichaete, pink	2
ebony	3
Dichaete, ebony, pink	12
wild type	13

(a) Haga un esquema de este cruce, mostrando los genotipos de los padres y de los descendientes de ambos cruces.

(b) ¿Cuál es la secuencia y la distancia entre estos tres genes?

18. Se cruzaron hembras de *Drosophila*, homozigotas para los genes *pink* y *ebony* del tercer cromosoma (los mismos genes del Problema 17) con machos homozigotos para el gen *dumpy* del segundo cromosoma. Ya que estos genes son recesivos, todos los descendientes fueron de tipo silvestre (normales). Se realizo un cruce prueba entre las hembras F_1 y machos recesivos triple mutantes. Si asumimos que los dos genes ligados, *pink* y *ebony*, se encuentran a 20 um, prediga los resultados de este cruce. Si se hubiera hecho el cruce recíproco (machos F_1 —en donde no hay entrecruzamiento— con hembras recesivas triple mutantes), ¿cómo variarían los resultados, si es que lo hacían?

19. En *Drosophila*, dos mutaciones, *Stubble* (*Sb*) y *curled* (*cu*), están ligadas en el cromosoma 3. *Stubble* es un gen dominante, letal en homozigosis, y *curled* es recesivo. Si una hembra de genotipo

$$\frac{Sb \quad cu}{+ \quad +}$$

se cruza para detectar recombinantes entre su descendencia, ¿qué genotipo masculino elegiría para este cruce?

20. En *Drosophila*, se cruzó una hembra heterozigota para los caracteres recesivos ligados al X *a*, *b* y *c* con un macho que expresaba fenotípicamente *a*, *b* y *c*. La descendencia presentaba las siguientes proporciones fenotípicas:

+	*b*	*c*	460
a	+	+	450
a	*b*	*c*	32
+	+	+	38
a	+	*c*	11
+	*b*	+	9

No se observó ningún otro fenotipo.

(a) Cuál es la situación de los alelos de estos genes en el cromosoma X de la hembra?

(b) Determine la secuencia correcta y construya un mapa de estos genes del cromosoma X.

(c) ¿Qué fenotipos faltan en la descendencia? ¿Por qué?

21. ¿Por qué Stern observó más «manchas gemelas» que manchas *singed* en su estudio del entrecruzamiento somático? Si hubiera estudiado el color del cuerpo *tan* (locus 27,5) y las quetas *forked* (locus 56,7) del cromosoma X a partir de hembras heterozigotas, ¿qué frecuencias relativas de manchas *tan,* manchas *forked* y «manchas gemelas» se esperaría que aparecieran?

22. La recombinación mitótica y el intercambio entre cromátidas hermanas ¿son efectivos para producir variabilidad genética en un individuo? ¿Y en la descendencia de los individuos?

23. ¿Qué posibles conclusiones se pueden deducir del hecho de que no se observa complejo sinaptinémico ni hay entrecruzamiento en los machos de *Drosophila* y en las hembras de *Bombyx mori* (el gusano de seda comercial)?

24. Se hizo un cruce prueba entre un organismo de genotipo *AaBbCc* y el triple recesivo (*aabbcc*). Los genotipos de la descendencia fueron los siguientes:

20	*AaBbCc*	20	*AaBbcc*
20	*aabbCc*	20	*aabbcc*
5	*AabbCc*	5	*Aabbcc*
5	*aaBbCc*	5	*aaBbcc*

(a) Asumiendo dominancia simple y recesividad en cada par de alelo y transmisión independientemente de estos tres genes ¿cuántas clases fenotípicas y genotípicas se obtendrían entre los descendientes y en qué proporciones?

(b) Conteste a la misma pregunta suponiendo que los tres genes están tan íntimamente ligados en un cromosoma que no se recuperan gametos recombinantes en la muestra de descendientes.

(c) ¿Qué puede concluir de los datos reales acerca de la localización de los tres genes, unos respecto de los otros?

25. Basándonos en nuestra discusión sobre la esperada imprecisión de las distancias de mapa (véase la Figura 5.13), ¿revisaría su respuesta al Problema 24? Y si fuera así, ¿de que manera?

26. En una planta, el fruto es rojo o amarillo y también oval o alargado, en donde rojo y oval son caracteres dominantes. Se hizo un cruce prueba con dos plantas heterozigotas para estos caracteres, con los siguientes resultados:

Fenotipo	Descendencia de la planta A	Descendencia de la planta B
rojo, alargado	46	4
amarillo, oval	44	6
rojo, oval	5	43
amarillo, alargado	5	47
	100	100

Determine la localización relativa de los genes entre sí y los genotipos de las dos plantas paternas.

27. En una planta heterozigota para dos pares de genes (*Ab*/*aB*), en donde los dos genes están ligados a una distancia de 25 um, se cruzaron dos de tales individuos. Asumiendo que hay entrecruzamiento tanto en la formación de gametos masculinos como de femeninos y que los alelos A y B son dominantes, determine la proporción fenotípica de los descendientes.

28. En un cruce con *Neurospora* con dos alelos *B* y *b*, se observó el siguiente patrón de tétradas:

Patrón de tétradas	Número
BBbb	36
bbBB	44
BbBb	4
bBbB	6
BbbB	3
bBBb	7

Calcular la distancia entre el gen y el centrómero.

29. En *Neurospora*, el cruce a+ × +*b* produjo sólo dos tipos de tétradas ordenadas, aproximadamente en igual número:

	Par de esporas							
	1–2		3–4		5–6		7–8	
Tétrada tipo 1	*a*	+	*a*	+	+	*b*	+	*b*
Tétrada tipo 2	+	+	+	+	*a*	*b*	*a*	*b*

¿Qué se puede concluir?

30. A continuación hay dos series de datos, derivados de cruces en *Chlamydomonas,* para tres genes con los alelos mutantes *a, b* y *c*.

Genes	Cruce	P	NP	T
1	*a* y *b*	36	36	28
2	*b* y *c*	79	3	18
3	*a* y *c*	?	?	?

Determine, hasta donde pueda, la situación de estos tres genes. Describa los resultados esperados del cruce 3 suponiendo que *a* y *c* están ligados, alejados 38 um, y que se han producido 100 tétradas.

31. En *Chlamydomonas*, el cruce *ab* × ++ produjo las siguientes tétradas desordenadas, en donde *a* y *b* están ligados.:

(1)	+ + + + *a b* *a b*	38	(3)	*a* + *a* + + *b* + *b*	6	(5)	*a b* + + + *b* *a* +	2
(2)	+ + *a b* + + *a b*	5	(4)	*a b* *a* + + *b* + +	17	(6)	*a b* + *b* *a* + + +	3

(a) Identifique las clases que representan a los ditipos paternos (P), los ditipos no paternos (NP) y los tetratipos (T).

(b) Explique el origen de la clase (2).

(c) Determine la distancia de mapa entre *a* y *b*.

32. Los siguientes resultados son pares de tétradas ordenadas de un cruce entre una cepa *cd* y una cepa ++:

Clase de tétrada						
1	2	3	4	5	6	7
c +	*c* +	*c d*	+ *d*	*c* +	*c d*	*c* +
c +	*c d*	*c d*	*c* +	+ +	+ +	+ *d*
+ *d*	+ +	+ +	*c* +	*c d*	*c d*	*c d*
+ *d*	+ *d*	+ +	+ *d*	+ *d*	+ +	+ +
1	17	41	1	5	3	1

Se resumen por clases de tétradas.

(a) Indique el tipo de asca de cada clase de la 1 a la 7 (P, NP o T).

(b) Los datos anteriores apoyan la conclusión de que los loci *c* y *d* están ligados. Indique las pruebas que apoyan esta conclusión.

(c) Calcule la distancia gen-centrómero para cada locus.

(d) Calcule la distancia entre los dos loci ligados.

(e) Deduzca el mapa del cromosoma, incluyendo al centrómero, y explique la discrepancia entre las distancias determinadas por los dos métodos diferentes en las partes (c) y (d).

(f) Indique la situación de los entrecruzamientos necesarios para producir las ascas de la clase 6.

33. En un cruce en *Chlamydomonas*, $AB \times ab$, se recuperaron 211 ascas desordenadas:

10	*AB*,	*Ab*,	*aB*,	*ab*
102	*Ab*,	*aB*,	*Ab*,	*aB*
99	*AB*,	*AB*,	*ab*,	*ab*

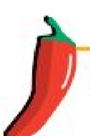
(a) Correlacione cada uno de los tres tipos de tétrada del problema con su designación apropiada (nombres).

(b) ¿Están los genes *A* y *B* ligados?

(c) Si están ligados, determine la distancia de mapa entre los dos genes. Si no están ligados, proporcione la mayor información posible que pueda aportar de por qué deduce esta conclusión.

34. Se examinaron cierto número de clones de célula híbridas somáticas humano-ratón para comprobar la expresión de genes humanos concretos y la presencia de cromosomas humanos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla. Asigne cada gen al cromosoma en el que está localizado.

	Clon de células híbridas					
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Genes que se expresan						
ENO1 (enolasa 1)	−	+	−	+	+	−
MDH1 (malato deshidrogenasa 1)	+	+	−	+	−	+
PEPS (peptidasa S)	+	−	+	−	−	−
PGM1 (fosfo-glucomutasa 1)	−	+	−	+	+	−
Cromosomas (presentes o ausentes)						
1	−	+	−	+	+	−
2	+	+	−	+	−	+
3	+	+	−	−	+	−
4	+	−	+	−	−	−
5	−	+	+	+	+	+



Problemas extra-picantes

35. Una hembra de genotipo

$$\frac{a \quad b \quad c}{+ \quad + \quad +}$$

produce en la meiosis 100 tétradas. De estas, 68 no eran recombinantes. De las 32 restantes, 20 eran recombinantes entre *a* y *b*, 10 entre *b* y *c* y 2 doble recombinantes entre *a* y *b* y entre *b* y *c*. De los 400 gametos producidos, ¿cuántos habrá de cada uno de los ocho genotipos posibles? Suponiendo que el orden de los alelos es *a-b-c*, ¿cuál es la distancia de mapa entre estos loci?

36. En un laboratorio, a un estudiante de genética se le asignó una mutación de *Drosophila* desconocida que tenía ojos blancuzcos. Cruzó hembras de su cepa pura mutante con machos silvestres (ojos rojo ladrillo), recuperando todas las moscas F_1 de tipo silvestre. En la generación F_2, recuperó los siguientes descendientes en las proporciones siguientes:

tipo silvestre	5/8
ojos rojo brillante	1/8
ojos marrones	1/8
ojos blancos	1/8

El estudiante estaba confuso hasta que el instructor le sugirió que quizá los ojos blanquecinos de la cepa original era la consecuencia de la homozigosis de una mutación para ojos marrones y de una mutación para ojos rojo brillante, un caso de interacción génica. (Véase el Capítulo 4.) Después de pensar mucho, el estudiante pudo analizar los datos, explicar los resultados y aprender varias cosas sobre la localización relativa de los dos genes. Una clave para su comprensión fue que en las hembras de *Drosophila* se produce entrecruzamiento, pero no en los machos. Basándose en su análisis, ¿qué es lo que el estudiante aprendió acerca de los dos genes?

37. *Drosophila melanogaster* tiene un par de cromosomas sexuales (XX o XY) y tres pares de autosomas, denominados cromosomas 2, 3 y 4. Una estudiante de genética descubrió una mosca macho con patas muy cortas. Utilizando este macho, la estudiante pudo establecer una cepa pura de este mutante, que era recesivo. Luego construyó una cepa pura con su mutante y los genes recesivos *black* (color oscuro del cuerpo, localizado en el cromosoma 2) y *pink* (color rosado del ojo, localizado en el cromosoma 3). Cruzó una hembra de la cepa homozigota *black*, *pink*, patas cortas con una macho de tipo silvestre. Los machos F_1 de este cruce fueron de tipo silvestre y se retrocruzaron con hembras homozigotas para los tres genes recesivos. En la tabla que sigue se reflejan los resultados de la F_2. No se observó ningún otro fenotipo.

	Silvestre	Rosados*	Oscuros, Patas cortas	Oscuros, Rosados, Patas cortas
Females	63	58	55	69
Males	59	65	51	60

*Aquí se indica que los otros dos caracteres son de tipo silvestre, y así en los demás.

(a) Basándose en estos resultados, la estudiante pudo asignar el gen para patas cortas a un grupo de ligamiento (un cromosoma).
¿Cuál fue? Razónelo paso a paso.

(b) La estudiante repitió el experimento haciendo los cruces recíprocos, de hembras F_1 retrocruzadas con machos homozigotos recesivos. Observó que el 85 por ciento de los descendientes pertenecían a las clases anteriores, pero el 15 por ciento se dividía por igual entre machos y hembras de fenotipos *black* + *pink*, *black* + +, + patas cortas *pink* y + patas cortas +. ¿Cómo se pueden explicar estos resultados y qué información pueden aportar?

38. En *Drosophila*, una hembra es heterozigota para tres mutaciones, ojos *Bar* (*B*), alas *miniature* (*m*), y cuerpo *ebony* (*e*). Advierta que *Bar* es una mutación dominante. La mosca se cruza con un macho de ojos normales, alas *miniature* y cuerpo *ebony*. Los resultados se muestran a continuación:

111	*miniature*	101	*Bar, ebony*
29	tipo silvestre	31	*Bar, miniature, ebony*
117	*Bar*	35	*ebony*
26	*Bar, miniature*	115	*miniature, ebony*

Interprete los resultados de este cruce. Si concluye que hay ligamiento entre cualquiera de los genes, determine las distancias de mapa entre ellos.

LECTURAS SELECCIONADAS

Allen, G.E. 1978. *Thomas Hunt Morgan: The man and his science.* Princeton, NJ: Princeton University Press.

Chaganti, R., Schonberg, S., and German, J. 1974. A manyfold increase in sister chromatid exchange in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4508-12.

Creighton, H.S., and McClintock, B. 1931. A correlation of cytological and genetical crossing over in *Zea mays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 17:492-97.

Douglas, L., and Novitski, E. 1977. What chance did Mendel's experiments give him of noticing linkage? *Heredity* 38:253-57.

Ellis, N.A. et al. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83:655-66.

Ephrussi, B., and Weiss, M.C. 1969. Hybrid somatic cells. *Sci. Am.* (April) 220:26-35.

Lindsley, D.L., and Grell, E.H. 1972. *Genetic variations of Drosophila melanogaster.* Washington, DC: Carnegie Institute of Washington.

Morgan, T.H. 1911. An attempt to analyze the constitution of the chromosomes on the basis of sex-linked inheritance in *Drosophila. J. Exp. Zool.* 11:365-414.

Morton, N.E. 1955. Sequential test for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7:277-318.

— 1995. *LODs*—past and present. *Genetics* 140:7-12.

Neuffer, M.G., Jones, L., and Zober, M. 1968. *The mutants of maize.* Madison, WI: Crop Science Society of America.

Perkins, D. 1962. Crossing-over and interference in a multiply marked chromosome arm of *Neurospora. Genetics* 47:1253-74.

Ruddle, F.H., and Kucherlapati, R.S. 1974. Hybrid cells and human genes. *Sci. Am.* (July) 231:36-49.

Stahl, F.W. 1979. *Genetic recombination.* New York: W.H. Freeman.

Stern, H., and Hotta, Y. 1973. Biochemical controls in meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 7:37-66.

— 1974. DNA metabolism during pachytene in relation to crossing over. *Genetics* 78:227-35.

Sturtevant, A.H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J. Exp. Zool.* 14:43-59.

— 1965. *A history of genetics.* New York: Harper & Row.

Voeller, B.R., ed. 1968. *The chromosome theory of inheritance: Classical papers in development and heredity.* New York: Appleton-Century-Crofts.

von Wettstein, D., Rasmussen, S.W., and Holm, P.B. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18:331-414.

Wolff, S., ed. 1982. *Sister chromatid exchange.* New York: Wiley-Interscience.

Análisis genético y mapas en bacterias y bacteriófagos



Micrografía electrónica de transmisión de E. coli en conjugación.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- Los genomas bacterianos tienen muy a menudo un único cromosoma circular.
- Las bacterias han desarrollado numerosos modos para recombinar la información genética entre células.
- La capacidad para realizar la conjugación y transferir el cromosoma bacteriano de una célula a otra está gobernada por la presencia de información genética en el DNA de un factor de «fertilidad» o factor F.
- El factor F se puede encontrar en el citoplasma de la célula como un plásmido, o se puede integrar en el cromosoma bacteriano, en donde facilita la transferencia del cromosoma de la célula dadora a la receptora dando lugar a recombinación.
- En la conjugación, la recombinación proporciona la base para cartografiar los genes bacterianos.
- Los bacteriófagos son virus que parasitan a las bacterias.
- En la infección de la bacteria, se inyecta el DNA del bacteriófago en la célula huésped, en donde se replica y dirige la reproducción del bacteriófago.
- Durante la infección del bacteriófago, después de la replicación, el DNA del fago puede recombinar, lo cual sirve para construir mapas intergénicos e intragénicos.

Desviamos ahora nuestra atención a la discusión de varios fenómenos genéticos en **bacterias** (procariotas) y **bacteriófagos,** virus que a menudo se denominan simplemente fagos. Estos virus se denominan así porque parasitan bacterias. El estudio de las bacterias y de los bacteriófagos ha sido esencial en el progreso del conocimiento en muchas áreas de estudio genético. Por ejemplo, gran parte de lo que hemos discutido anteriormente acerca de la genética molecular, se dedujo inicialmente del trabajo experimental con estos organismo. Además, como veremos en el Capítulo 19, el conocimiento sobre las bacterias y sus plásmidos ha servido de base para su amplio uso en la clonación del DNA y en otros estudios de DNA recombinante.

Las bacterias y sus virus han sido organismos de investigación especialmente útiles en genética por una serie de razones. Primero, tienen ciclos reproductivos extremadamente cortos. Literalmente, en cientos de generaciones se pueden obtener miles de millones de bacterias o de fagos genéticamente idénticos en cortos periodos de tiempo. Además, se pueden estudiar en cultivos puros, por lo que se pueden aislar cepas mutantes de bacterias o bacteriófagos genéticamente únicos e investigarlos independientemente.

En este capítulo, nuestro mayor énfasis se centrará en cómo una célula bacteriana puede adquirir información genética de otra célula. Esto se puede dar de numerosas formas y una vez que la información ha entrado en la célula receptora, puede recombinarse con el cromosoma de la receptora, dando lugar a un genotipo bacteriano modificado. En estos microorganismos han evolucionado procesos complejos que facilitan la recombinación. Como veremos, estos procesos son el fundamento para la realización de análisis de mapas cromosómicos en las bacterias. También estudiaremos la recombinación y los mapas en los bacteriófagos.

6.1 Las bacterias mutan espontáneamente y crecen a un ritmo exponencial

Los estudios genéticos en bacterias dependen de nuestra habilidad para estudiar las mutaciones en estos organismos. Desde la década de 1940 se sabía que cultivos de bacterias, genéticamente homogéneos, podían dar lugar, ocasionalmente, a células que presentaban variaciones heredables, particularmente en relación con el crecimiento en condiciones ambientales especiales. Antes de 1943, la causa de dicha variación era debatida calurosamente. La mayoría de los bacteriólogos creía que los cambios ambientales inducían cambios en ciertas bacterias que les permitía sobrevivir o adaptarse a nuevas situaciones. Por ejemplo, se sabía que cepas de *E. coli* eran sensibles a la infección por el bacteriófago T1. La infección por el bacteriófago T1 daba lugar a la reproducción de los virus a expensas de las bacterias, que se lisaban (se destruían) en el proceso. Si en una placa con *E. coli* se sembraba de manera homogénea T1, casi todas las células se lisaban. Sin embargo, algunas pocas células de *E. coli* sobrevivían a la infección y no se lisaban. Si se aislaban estas células y se establecía un cultivo puro, todos los descendientes eran resistentes a la infección por T1. Para explicar estas observaciones se propuso la **hipótesis adaptativa**, que implica que para la adquisición de la inmunidad es esencial la interacción entre el fago y la bacteria. En otras palabras, la exposición al fago «induce» la resistencia en las bacterias. Por otro lado, la aparición de **mutaciones espontáneas**, que se producen en presencia o en ausencia del fago T1, sugieren un modelo alternativo para explicar el origen de la resistencia en *E. coli*. En 1943, Salvador Luria y Max Delbruck presentaron pruebas convincentes de que las bacterias, como los organismos eucariotas, son capaces de mutar espontáneamente. Este experimento, denominado la **prueba de la fluctuación**, marca el inicio del estudio moderno de la genética bacteriana. Exploraremos este descubrimiento en el Capítulo 15. La mutación espontánea se considera en la actualidad la fuente primaria de variación genética en las bacterias.

Las células mutantes que aparecen espontáneamente en, por otra parte, cultivos puros, se pueden aislar y establecerse independientemente de la cepa paterna utilizando técnicas de selección. La selección es el cultivo del organismo en condiciones en donde solo el mutante que se busca crezca bien, mientras que el tipo silvestre no lo haga. Utilizando los diseños selectivos cuidadosamente, en la actualidad se puede inducir y aislar mutaciones para casi cualquier característica que se desee. Debido a que las bacterias y los virus tienen un único cromosoma y son por consiguiente haploides, todas las mutaciones se expresarán directamente en los descendientes de las células mutantes, facilitando el estudio de estos microorganismos.

Las bacterias crecen en un medio de cultivo líquido o en una placa de Petri, sobre una superficie de agar semisólida. Si los componentes nutritivos del medio de crecimiento son muy simples y constan sólo de una fuente de carbono orgánico (como glucosa o lactosa) y una serie de iones, como Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++} y NH_4^+, presentes como sales inorgánicas, se denomina **medio mínimo**. Para crecer en tal medio, una bacteria debe ser capaz de sintetizar todos los componentes orgánicos esenciales (p.e., aminoácidos, purinas, pirimidinas, azúcares, vitaminas y ácidos grasos). Una bacteria que puede llevar a cabo esta notable hazaña biosintética —algo que nosotros mismos no podemos hacer— se denomina **protótrofa**. Se dice que es de tipo silvestre en cuanto a los requerimientos nutritivos y puede crecer en el medio mínimo. Por otro lado, si una bacteria pierde, por mutación, la capacidad para sintetizar uno o más componentes orgánicos, se dice que es **auxótrofa**. Por ejemplo, una bacteria que pierde la capacidad para fabricar histidina, se designa auxótrofa his^-, en oposición a la protótrofa his^+. Para que la bacteria his^- crezca, se tiene que añadir dicho aminoácido como suplemento al medio mínimo. El medio que ha sido ampliamente suplementado se denomina *medio completo*.

Para estudiar bacterias mutantes de un modo cuantitativo, se sitúa un inóculo bacteriano (una pequeña cantidad de 0,1 ml

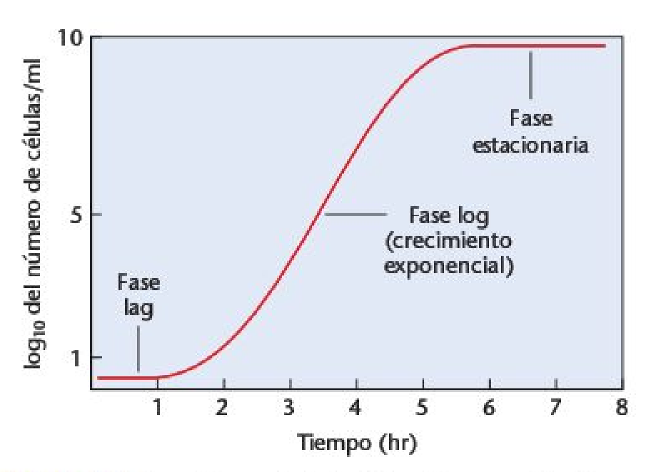


FIGURA 6.1 Curva de crecimiento típica de una población bacteriana, en la que se observa la fase inicial lag, la fase posterior log, durante la que se da el crecimiento exponencial, y la fase estacionaria, que se presenta cuando se han consumido los nutrientes.

o 1,0 ml) en un medio de cultivo líquido. La bacteria presentará un patrón de crecimiento característico, tal como se ilustra en la Figura 6.1. Inicialmente, durante la **fase lag**, el crecimiento es lento. Luego sigue un periodo de crecimiento rápido llamado la **fase log**. En esta fase las células se dividen continuamente con un intervalo de tiempo fijo entre divisiones celulares, que da lugar a un crecimiento exponencial. Cuando la bacteria alcanza una densidad celular de unas 10^9 células/ml, los nutrientes y el oxígeno llegan a ser limitantes y las células entran en una **fase estacionaria**. Como el tiempo en el que se dobla la población en la fase log puede ser de unos 20 minutos, con un inóculo inicial de unas pocas miles de células se puede alcanzar fácilmente una densidad celular máxima en un cultivo incubando durante la noche.

Las células que crecen en un medio líquido pueden cuantificarse transfiriéndolas a una placa de Petri con un medio semisólido. Después de la incubación y de muchas divisiones, cada célula da lugar a una colonia visible sobre la superficie del medio. El número de colonias permite estimar el número de bacterias presentes en el cultivo original. Si el número de colonias es demasiado grande como para poder contarlas, entonces se pueden hacer diluciones (una técnica llamada de dilución serial) del cultivo líquido original y sembrarlas, hasta que el número de colonias se reduzca a un punto en donde puedan contarse. Por ejemplo, supongamos que las tres placas de Petri de la Figura 6.2, representan la siembra de 1 ml de diluciones de 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5} respectivamente (de izquierda a derecha)[1]. Necesitamos sólo seleccionar la placa en donde el número de colonias se pueda contar adecuadamente. Debido a que cada colonia surge probablemente de una sola bacteria, el número de colonias, teniendo en cuenta el factor de dilución, representa el número de bacterias en el mililitro original. En este caso la placa más a la derecha tiene 15 colonias. Como se trata de una dilución de 10^{-5}, el número inicial de bacterias se estima en 15×10^5 por mililitro.

6.2 La conjugación es una de las formas de recombinación en bacterias

El desarrollo de técnicas que permitieron la identificación y el estudio de las mutaciones bacterianas, condujo a investigaciones detalladas sobre la disposición de los genes en el cromosoma bacteriano. Joshua Lederberg y Edward Tatum iniciaron estos estudios en 1946, demostrando que las bacterias sufren **conjugación**, un proceso mediante el que la información genética de una bacteria se transfiere y recombina con la de otra bacteria. (Véase la fotografía al comienzo de este capítulo.) Como en el entrecruzamiento meiótico en eucariotas, este proceso de **recombinación** en bacterias proporciona las bases para el desarrollo de metodologías de cartografía cromosómica. Advierta que el término *recombinación*, cuando se aplica a bacterias y bacteriófagos, da lugar a la sustitución de uno o más genes presentes en una cepa por los de una cepa genéticamente

[1] 10^{-5} representa una dilución de 1:100.000.

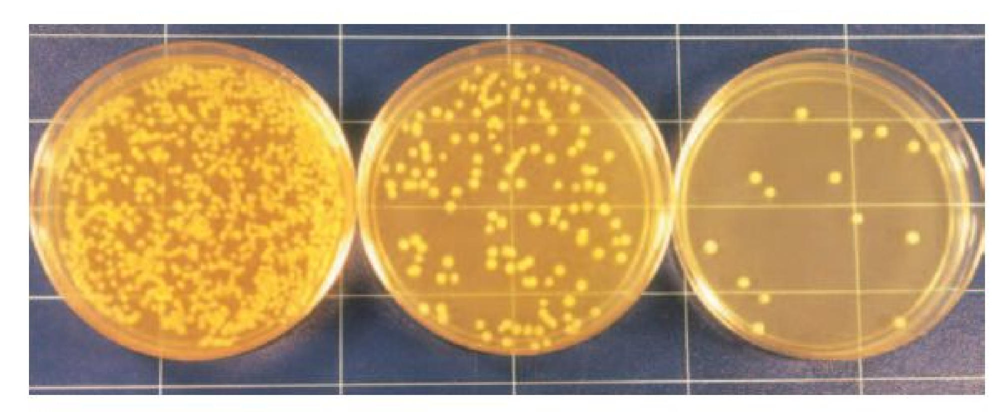


FIGURA 6.2 Resultados de la técnica de dilución seriada y posterior cultivo de bacterias. Cada una de las diluciones varía por un factor de 10. Cada colonia deriva de una sola bacteria.



distinta. Aunque esto es algo diferente respecto del concepto de *recombinación* en eucariotas —en donde el término describe el entrecruzamiento que resulta en un intercambio recíproco— el efecto global es el mismo: La información genética de un cromosoma se transfiere a otro, modificando al genotipo. Otros dos fenómenos, la **transformación** y la **transducción**, también dan lugar a la transferencia de información genética de una bacteria a otra y también se han utilizado para determinar la disposición de los genes en el cromosoma bacteriano. Volveremos a discutir estos procesos más adelante en este capítulo.

Los experimentos iniciales de Lederberg y Tatum se realizaron con dos cepas auxótrofas múltiples (mutantes nutricionales) de la cepa de *E. coli* K12. La cepa A requería metionina (met) y biotina (bio) para poder crecer, mientras que la cepa B requería treonina (thr), leucina (leu) y tiamina (thi), como se muestra en la Figura 6.3. Ninguna de las dos cepas podría crecer en un medio mínimo. Las dos cepas se sembraron primero separadamente en un medio suplementado, y luego se mezclaron células de ambas cepas y se hicieron crecer juntas durante varias generaciones. Luego se sembraron en un medio mínimo. Cualquier célula bacteriana que creciera en el medio mínimo sería protótrofa. Es muy improbable que cualquiera de las células con dos o tres genes mutantes hubiera sufrido mutaciones espontáneas simultáneamente en los dos o tres loci, dando lugar a células silvestres. Por consiguiente, los investigadores asumieron que cualquier protótrofo recuperado debía haber surgido como consecuencia de alguna forma de intercambio genético y recombinación entre las dos cepas mutantes.

En este experimento se recuperaron protótrofos con una tasa de una célula cada 10^7 células sembradas, a una tasa de 10^{-7}.

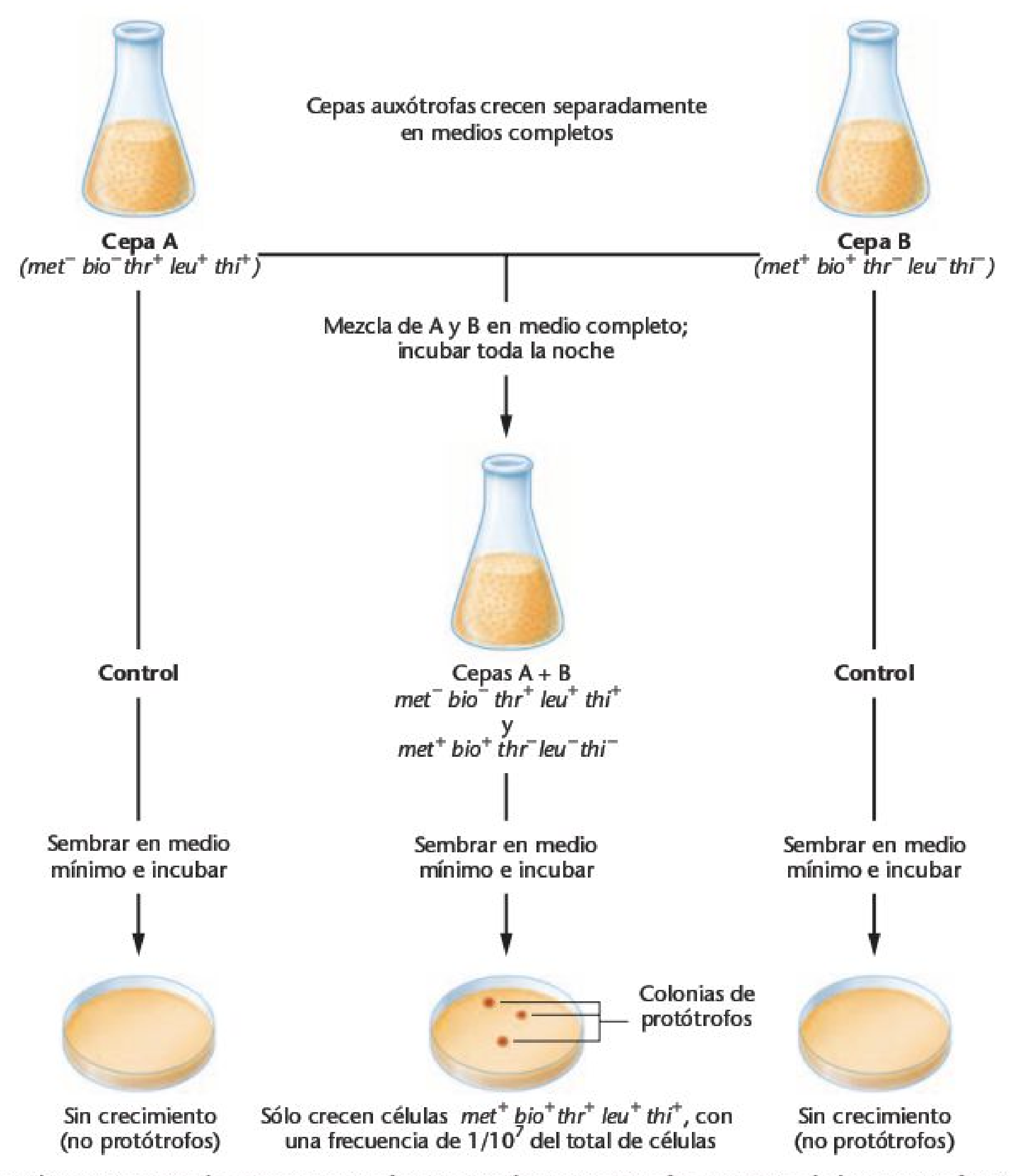


FIGURA 6.3 Recombinación entre dos cepas auxótrofas que producen protótrofos. Ninguno de los auxótrofos crecerá en un medio mínimo, pero sí que lo harán los protótrofos, sugiriendo que se ha producido recombinación.

Los controles de este experimento fueron sembrar por separado células de las cepas A y B en un medio mínimo. No se recuperaron protótrofos. Basándose en estas observaciones, Lederberg y Tatum propusieron que, aunque el fenómeno era realmente raro, había ocurrido recombinación.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿De que manera los genéticos detectaron y estudiaron genes mutantes en bacterias?

Bacterias F^+ y F^-

A los descubrimientos de Lederberg y Tatum les siguieron muy pronto numerosos experimentos diseñados para aclarar la naturaleza física y las bases genéticas de la conjugación. Rápidamente quedó claro que diferentes cepas de bacterias estaban implicadas en una transferencia unidireccional de material genético. Cuando las células servían de donantes de parte de su cromosoma, se denominaron **células F^+** (F por «fertilidad»). Las bacterias receptoras reciben material cromosómico del donante (que ahora se sabe es el DNA) que recombina con parte de su propio cromosoma. Se denominan **células F^-.**

Posteriormente se constató que el contacto entre las células era esencial para la transferencia cromosómica. Bernard Davis proporcionó apoyo a esta idea, diseñando un tubo en U en el que crecían células F^+ y F^- (Figura 6.4). En la base del tubo había un filtro de porcelana con un tamaño de poro que permitía el paso del medio líquido, pero que era demasiado pequeño como para permitir el paso de las bacterias. Las células F^+ se situaron a un lado del filtro y las F^- al otro. El medio se desplazaba a un lado y otro del filtro, por lo que las células bacterianas compartían esencialmente un medio común durante la incubación. Davis sembró muestras en ambos lados del tubo con un medio mínimo, pero no se recuperaron protótrofos. Concluyó que *el* contacto físico es esencial para la recombinación. Sabemos ahora que esta interacción física es la fase inicial del proceso de conjugación y se realiza mediante un tubo de conjugación denominado **pilus F** (o **pilus sexual**). Las bacterias tienen a menudo muchos pili, que son extensiones microscópicas de la célula parecidas a tubos. Diferentes tipos de pili realizan diferentes funciones celulares, pero todos los pili están implicados de alguna manera con la adhesión. Una vez se ha establecido el contacto entre las parejas que se cruzan vía el pili F (Figura 6.5), comienza la transferencia del cromosoma.

Posteriormente se tuvieron pruebas de que las células F^+ tenían un **factor de fertilidad** (llamado **factor F**), que les confiere capacidad para donar parte de su cromosoma en la conjugación. En experimentos realizados por Joshua y Esther Lederberg y por William Hayes y Luca Cavalli-Sforza, se demostró que en ciertas condiciones ambientales el factor F podía eliminarse de las células anteriormente fértiles. Sin embargo, si se hacía crecer estas células «no fértiles» con células donantes fértiles, el factor F se recuperaba.

La conclusión de que el factor F es un elemento móvil, se confirmó posteriormente por la observación de que, después de la conjugación, las células receptoras F^- se convertían siempre en F^+. Así, además del caso *raro* de transferencia de genes del cromosoma bacteriano (recombinación), el factor F pasa a todas las células receptoras. De acuerdo con esto, los cruces

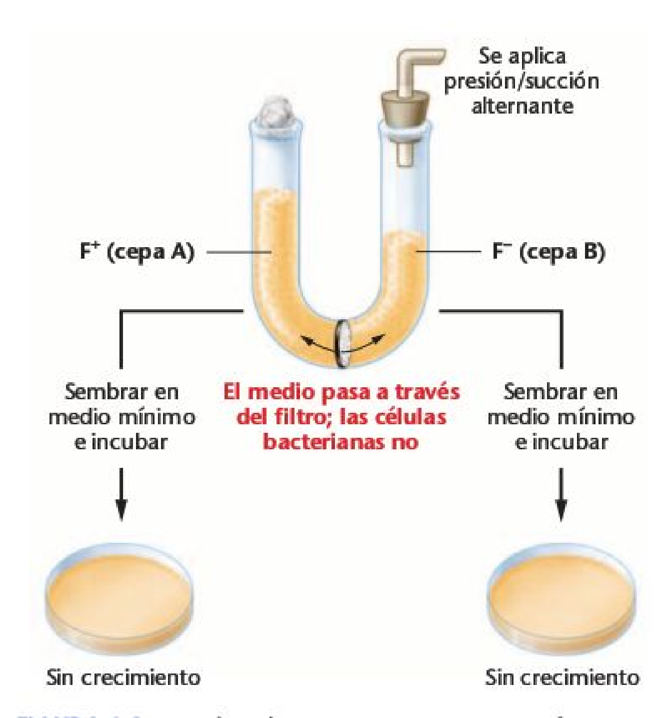


FIGURA 6.4 Cuando se hacen crecer cepas auxótrofas A y B en un medio común, pero separadas por un filtro, no hay recombinación y no se producen protótrofos. El aparato que se muestra es un tubo en U de Davis.



FIGURA 6.5 Micrografía electrónica de la conjugación entre una célula de *E. coli* F^+ y otra F^-. El pilus sexual es claramente visible.

iniciales de Lederberg y Tatum (Figura 6.3) se pueden denominar como sigue:

Cepa A		Cepa B
F^+ (DONANTE)	×	F^- (RECEPTORA)

La caracterización del factor F confirmó estas conclusiones. Como el cromosoma bacteriano, pero distinto a él, se ha demostrado que el factor F es una molécula de DNA circular de doble cadena con una longitud de unos 100.000 pares de nucleótidos. El factor F tiene, entre otros, más de 20 genes cuyos productos están implicados en la transferencia de la información genética, Llamados genes *tra*, incluyen aquellos que son esenciales para la formación del pilus sexual.

Como veremos pronto, el factor F es en realidad una unidad genética autónoma, que se denomina **plásmido**. Sin embargo, en nuestra explicación histórica de su descubrimiento en este capítulo, continuaremos refiriéndonos a él como un «factor.»

El comportamiento del factor F durante la conjugación se esquematiza en una serie de pasos en la Figura 6.6. Se cree que la transferencia del factor F en la conjugación implica la sepa-

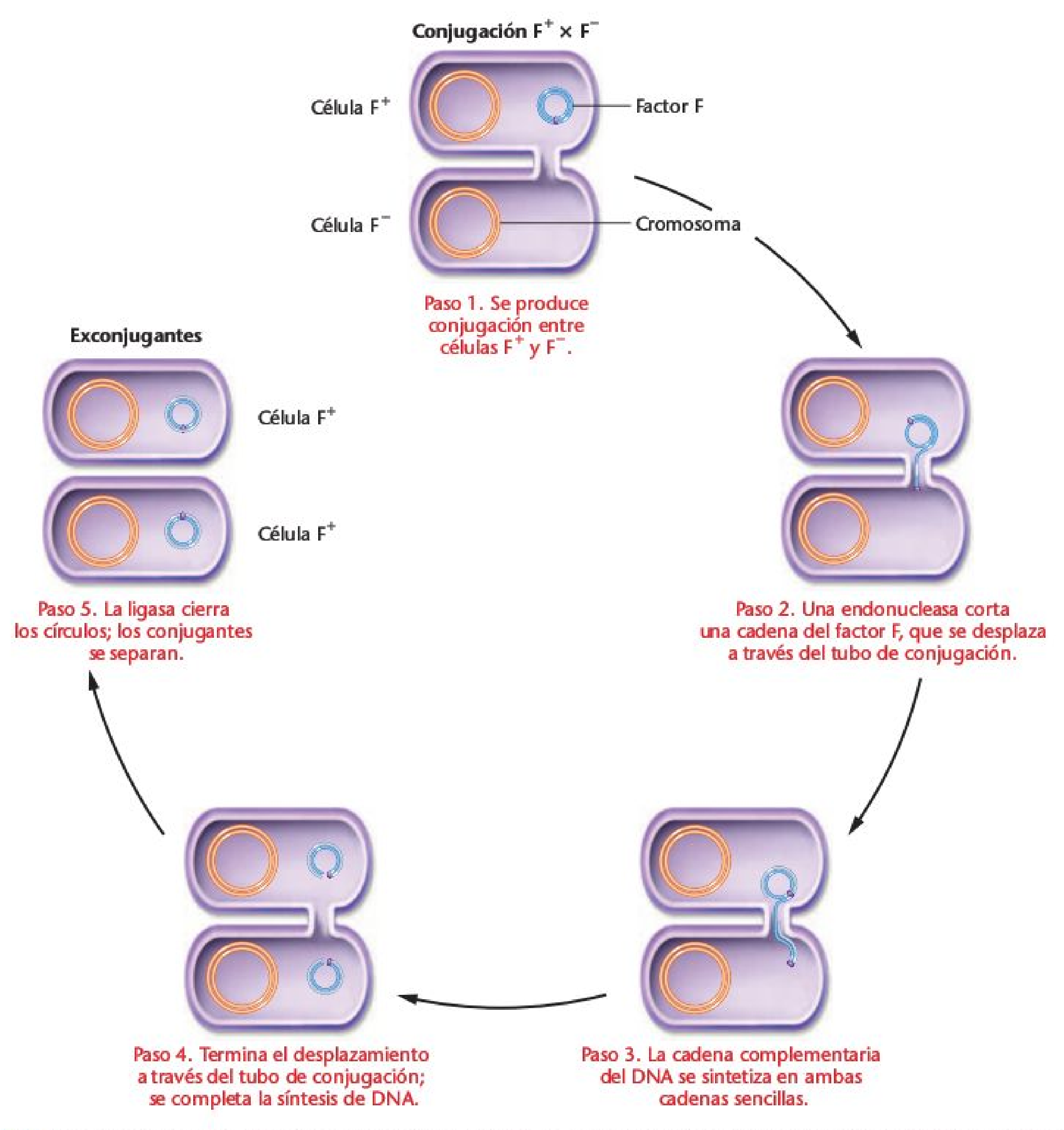


FIGURA 6.6 Cruce $F^+ \times F^-$ que demuestra como la célula receptora F^- se convierte en F^+. Durante la conjugación se replica el DNA del factor F y una copia nueva entra en la célula receptora, convirtiéndola en F^+. Se ha añadido una barrita negra a los factores F para seguir su rotación en el sentido de las agujas del reloj.

ración de las dos cadenas de su doble hélice y el desplazamiento de una de las cadenas hacia la célula receptora (paso 2). La otra cadena permanece en la célula donante. Ambas cadenas, una que pasa por el tubo de conjugación y la otra que se queda en la célula donante, se replican (pasos 3 y 4). El resultado es que tanto las células donantes como las receptoras son F^+ cuando se completa la conjugación (paso 5).

En resumen, las células de *E. coli* pueden o no contener el factor F. Cuando está presente, la célula es capaz de formar un pilus sexual y actuar potencialmente como dadora de información genética. En la conjugación casi siempre se transfiere una copia del factor F de la célula F^+ a la célula receptora F^-, convirtiéndola en F^+. Queda la pregunta de cual es el porcentaje exacto, muy bajo, de células implicadas en estos cruces (10^{-7}) que sufren también recombinación. Así mismo, no estaba claro qué tenía que ver la transferencia del factor F con la transferencia y recombinación de un gen dado. Las respuestas a estas cuestiones esperaban más investigación. Los descubrimientos posteriores no sólo clarificaron cómo ocurre la recombinación, sino que también definieron un mecanismo mediante el cual el cromosoma de *E. coli* pudo cartografiarse. Nos centraremos primero en los mapas de cromosomas.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que el contacto entre las células precede a la recombinación en bacterias? ¿Cómo se descubrió que las bacterias sufren recombinación, por lo que los genes pueden transferirse del cromosoma de un organismo al de otro?

Bacterias Hfr y mapas de cromosomas

En 1950, Cavalli-Sforza trató a una cepa F^+ de *E. coli* con gas mostaza, una sustancia química que se sabe induce mutaciones. De estas células tratadas, recuperó una cepa bacteriana donante que sufría una tasa de recombinación de $1/10^4$ (o 10^{-4}), 1.000 veces más frecuente que las cepas F^+ originales. En 1953, William Hayes aisló otra cepa que presentaba una elevada frecuencia similar de recombinación. Ambas cepas se designaron **Hfr**, o con **alta frecuencia de recombinación**.

Además de la elevada frecuencia de recombinación, se advirtió otra diferencia importante entre las cepas Hfr y las cepas F^+ originales. Si la cepa donante es Hfr, las células receptoras, aunque a veces presentan recombinación, nunca se convierten en Hfr —es decir, permanecen como F^-. Comparándolas, tendremos,

$$F^+ \times F^- \longrightarrow \text{Las receptoras se convierten en } F^+$$

$$\text{Hfr} \times F^- \longrightarrow \text{Las receptoras permanecen } F^-$$

Quizá la característica más significativa de las cepas Hfr es la naturaleza de la recombinación. En cualquier cepa Hfr dada, ciertos genes recombinan más frecuentemente que otros, y algunos no lo hacen en absoluto. Se demostró que este patrón de transferencia de genes no aleatorio variaba de una cepa Hfr a otra. Aunque estos resultados eran enigmáticos, Hayes los interpretó diciendo que había ocurrido alguna alteración fisiológica del factor F, dando lugar a la producción de cepas Hfr de *E. coli*.

Hacia mediados de la década de 1950, experimentos de Ellie Wollman y François Jacob explicaron las diferencias entre las células Hfr y las F^+ y demostraron cómo con las células Hfr se podían obtener mapas de los cromosomas de *E. coli*. En los experimentos de Wollman y Jacob se mezcló cepas Hfr y cepas F^- resistentes a antibióticos, con los genes marcadores adecuados, y se comprobó la recombinación de genes concretos en momentos diferentes. Para llevar a cabo esto, se incubó primero un cultivo con una mezcla de una cepa Hfr y otra F^- y se extrajeron muestras en diversos momentos y se situaron en un agitador. La agitación separaba a las bacterias en conjugación de tal manera que se interrumpía de manera efectiva la transferencia del cromosoma. Para comprobar las células en cuanto a la recombinación después de la agitación, se sembraron en un medio con antibióticos, por lo que sólo se recuperaban las células receptoras.

Nuevos experimentos utilizando esta técnica, llamada la **técnica de la conjugación interrumpida**, demostraron que genes concreto de una cepa dada Hfr se transferían y recombinaban más pronto que otros. En la Figura 6.7 se ilustra este

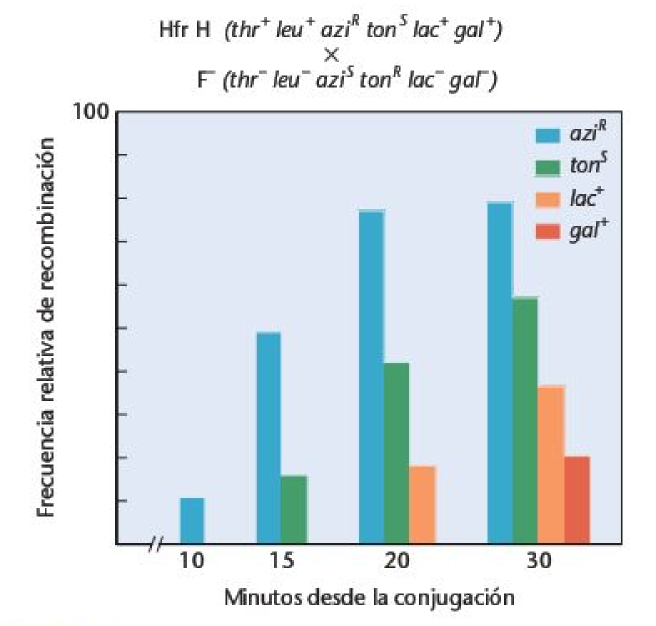


FIGURA 6.7 Transferencia progresiva en la conjugación de varios genes desde una cepa específica Hfr de *E. coli* a una cepa F^-. En esta cepa, ciertos genes (*azi* y *ton*) se transfieren más pronto que otros y recombinan más frecuentemente. Otros (*lac* y *gal*) tardan más tiempo en transferirse y recombinan con menor frecuencia. Otros (*thr* y *leu*) se transfieren siempre y se utilizan en la búsqueda inicial de recombinantes, pero no se muestran en el histograma.

punto. En los primeros 8 minutos, después de que las cepas se hubieran mezclado, no se detectó recombinación. Alrededor de los 10 minutos se detectó la recombinación del gen azi^R, pero no se detectó la transferencia de los genes ton^S, lac^+ o gal^+. A los 15 minutos el porcentaje de recombinantes azi^R aumento, y comenzaron a aparecer recombinantes ton^S. Sin embargo, todavía ninguno era lac^+ o gal^+. A los 20 minutos se encontró el gen lac^+ entre los recombinantes; y a los 30 minutos también se había comenzado a transferir gal^+. Por consiguiente, Wollman y Jacob habían demostrado una transferencia orientada de genes que estaba correlacionada con el tiempo que duraba la conjugación.

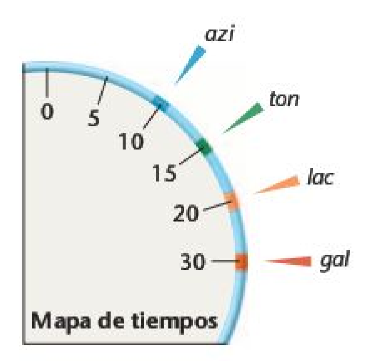


FIGURA 6.8 Un mapa de tiempos de los genes estudiados en el experimento representado en la Figura 6.7.

Parecía que el cromosoma de la bacteria Hfr se transfería linealmente y que el orden de los genes y la distancia entre ellos, medida en minutos, podía predecirse de tales experimentos (Figura 6.8). Esta información sirvió de base para el primer mapa genético del cromosoma de *E. coli*. Los *minutos* en el mapa bacteriano son equivalentes a las unidades de mapa en eucariotas.

Wollman y Jacob repitieron el mismo tipo de experimento con otras cepas Hfr, obteniendo resultados similares, pero con una diferencia importante. Aunque los genes siempre se transferían linealmente con el tiempo (como en su primer experimento), los genes que entraban primero y seguían después parecían variar de una cepa Hfr a otra [Figura 6.9(a)]. Cuando reexaminaron el orden de entrada de los genes, es decir, los diferentes mapas genéticos de cada cepa, surgió un patrón definido. Las diferencias más importantes entre todas las cepas se debían simplemente al punto de origen y a la dirección en la que procedía la entrada a partir de dicho punto [Figura 6.9(b)].

Para explicar estos resultados, Wollman y Jacob propusieron que el cromosoma de *E. coli* es circular (un círculo cerrado sin extremos libres). Si el punto de origen (*O*) variaba de una cepa a otra, se transferiría en cada caso una secuencia distintas de genes. Pero, ¿qué determina *O*? Propusieron que en las distintas cepas Hfr el factor F se integra en el cromosoma en puntos distintos y su posición determina el lugar *O*. Un caso de tal integración se muestra en una serie de pasos en la Figura 6.10. En conjugaciones posteriores entre esta célula Hfr y una F^-, la posición del factor F determina el punto inicial de transferencia (pasos 2 y 3). Aquellos genes próximos a *O* se transferirán primero. El mismo factor F es la última parte que se

(a)

Cepa Hfr	Orden de transferencia (el más temprano)							(el más tardío)
H	*thr* –	*leu* –	*azi* –	*ton* –	*pro* –	*lac* –	*gal* –	*thi*
1	*leu* –	*thr* –	*thi* –	*gal* –	*lac* –	*pro* –	*ton* –	*azi*
2	*pro* –	*ton* –	*azi* –	*leu* –	*thr* –	*thi* –	*gal* –	*lac*
7	*ton* –	*azi* –	*leu* –	*thr* –	*thi* –	*gal* –	*lac* –	*pro*

(b)

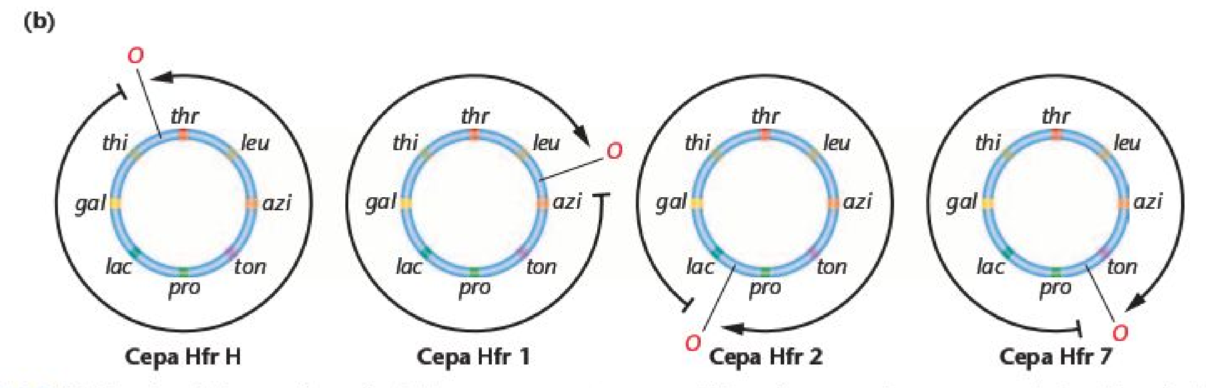


FIGURA 6.9 (a) El orden de la transferencia de los genes en cuatro cepas Hfr sugiere que el cromosoma de *E. coli* es circular. (b) En cada cepa se identifica el punto a partir del cual se origina (*O*) la transferencia. Adviértase que la transferencia puede ir en cualquier dirección, dependiendo de la cepa. El origen viene determinado por el punto de integración en el cromosoma del factor F, y la dirección de transferencia por la orientación del factor F cuando se integra.

transfiere (Paso 4). Sin embargo, la conjugación raramente, si es que lo hace, tarda el tiempo suficiente como para permitir que pase todo el cromosoma por el tubo de conjugación (Paso 5). Esta propuesta explica porqué las células receptoras, cuando se cruzan con células Hfr, permanecen F^-.

En la Figura 6.10 también se representa el modo en el que las dos cadenas de la molécula de DNA se desespiralizan durante la transferencia, permitiendo la entrada de una de las cadenas del DNA en la receptora (paso 3). Después de la replicación, el DNA tiene ahora la potencialidad de recombi-

FIGURA 6.10 La conversión del estado F^+ al Hfr ocurre por la integración del factor F en el cromosoma bacteriano (Paso 1). El punto de integración determina el origen (*O*) de la transferencia. Durante la conjugación (Pasos 2-4) una enzima corta al factor F, integrado ahora en el cromosoma huésped, iniciando la transferencia del cromosoma a partir de dicho punto. La conjugación normalmente se interrumpe antes de completarse la transferencia. En el esquema solo se han transferido los genes *A* y *B* a la célula F^- (Pasos 3-5), que pueden recombinar con el cromosoma huésped.

nar con las regiones homólogas del cromosoma huésped. La cadena de DNA que permanece en la donante también sufre replicación.

La utilización de la técnica de la conjugación interrumpida con diferentes cepas Hfr permitió a los investigadores construir el mapa completo del cromosoma de *E. coli*. La unidad de mapa se da en tiempo y para la cepa K12 (o *E. coli* K12) se demostró que tenía 100 minutos de largo. Mientras que el análisis actual del genoma del cromosoma de *E. coli* ha establecido la presencia de unas 4.000 secuencias que codifican proteínas, este procedimiento de cartografía original estableció la localización de unos 1.000 genes.

Ahora resuelva esto

El Problema 6.22 de la página 183 implica la comprensión de cómo el cromosoma bacteriano se transfiere durante la conjugación, dando lugar a recombinación y a la construcción de mapas.

Sugerencia: La transferencia del cromosoma es específica de cepa y depende de la posición en donde se integre el factor F en el cromosoma.

Recombinación en cruces $F^+ \times F^-$: revisión

El modelo anterior ha ayudado a los genéticos a comprender mejor cómo ocurre la recombinación en los cruces $F^+ \times F^-$. Recuerde que en estos casos la recombinación se produce muchos menos frecuentemente que en los cruces Hfr $\times F^-$, y que la transferencia de genes se realiza al azar. Lo más admitido es que cuando se mezclan células F^+ y F^-, la conjugación se da fácilmente y que cada célula F^- implicada en la conjugación con una célula F^+ recibe una copia del factor F, pero no se produce recombinación. Sin embargo, en una población de células F^+, el factor F se integra espontáneamente, con una frecuencia extremadamente baja, en puntos aleatorios del cromosoma bacteriano, convirtiendo a las células F^+ en Hfr, como vemos en la Figura 6.10. Por consiguiente, en los cruces $F^+ \times F^-$, la extremadamente baja frecuencia de recombinación (10^{-7}) se atribuye a las raras células Hfr que se forman, que luego se conjugan con células F^-. Debido a que el punto de integración del factor F es al azar, los genes transferidos por cualquiera de las nuevas células Hfr formadas también parecerá que sean al azar dentro de la gran población F^+/F^-. La bacteria receptora aparecerá como célula recombinante, pero de hecho seguirá siendo F^-. Si posteriormente sufre conjugación con una célula F^+, se convertirá en F^+.

El estado F' y los merozigotos

En 1959, en experimentos con cepas Hfr de *E. coli*, Edward Adelberg descubrió que el factor F podía perder su condición de integrado, dando lugar a la reversión al estado F^+, como se ilustra en una serie de pasos en la Figura 6.11. Cuando esto ocurre (paso 1), el factor F se lleva consigo, frecuentemente, varios genes bacterianos adyacentes (paso 2). Adelberg denominó a esta situación F' para distinguirla de la F^+ y de la Hfr. Así F', como Hfr, es otro caso especial de F^+. Esta conversión se describe como una de Hfr a F'.

La presencia de genes bacterianos en el factor citoplásmico F da lugar a una situación interesante. Una bacteria F' se comporta como una célula F^+, e inicia la conjugación con células F^- (paso 3). Cuando esto ocurre, el factor F, que contiene genes cromosómicos, se transfiere a la célula F^- (paso 4). En consecuencia, cualquier gen cromosómico que forme parte del factor F se encuentra ahora presente en duplicado en la célula receptora (paso 5) debido a que la receptora todavía tiene un cromosoma completo. Esto origina una célula parcialmente diploide, llamada **merozigoto**. Se pueden establecer cultivos puros de merozigotos F'. Han sido extremadamente útiles en el estudio de la regulación genética bacteriana, como se discutirá en el Capítulo 16.

6.3 El análisis mutacional condujo al descubrimiento de las proteínas Rec, esenciales para la recombinación bacteriana

Una vez que los investigadores establecieron que entre bacterias hay una transferencia unidireccional de DNA, se interesaron en determinar cómo ocurre realmente la recombinación en la célula receptora. ¿De qué manera el DNA donante sustituye a la región homóloga en el cromosoma receptor? Como en muchos sistemas, el mecanismo bioquímico implicado en la recombinación se descifró mediante estudios genéticos. Las principales ideas se obtuvieron como consecuencia del aislamiento de una serie de mutaciones relacionadas con un grupo de genes llamados *rec* (por recombinación).

La primera observación relevante tuvo que ver con una serie de genes mutantes denominados *recA*, *recB*, *recC* y *recD*. Se encontró que el primer gen mutante, *recA*, disminuía la recombinación en bacterias en unas mil veces, eliminándola casi por completo. Las otras mutaciones rec reducían la recombinación en unas 100 veces. Claramente, los productos normales de estos genes juegan algún papel esencial en el proceso de recombinación.

Buscando la presencia de un producto génico funcional en las células normales, pero que no estuviera en las células mutantes *rec*, los investigadores aislaron posteriormente varios productos génicos y se demostró que tenían un papel en la recombinación. El primero se denomina **proteína RecA**.[2] Esta

[2] Advierta que los nombres de los genes bacterianos comienzan con una letra minúscula y están en itálica. Los productos génicos correspondientes (proteínas) se designan comenzando con una letra mayúscula y con el tipo normal de letra. Por ejemplo, el gen *recA* codifica a la proteína RecA.

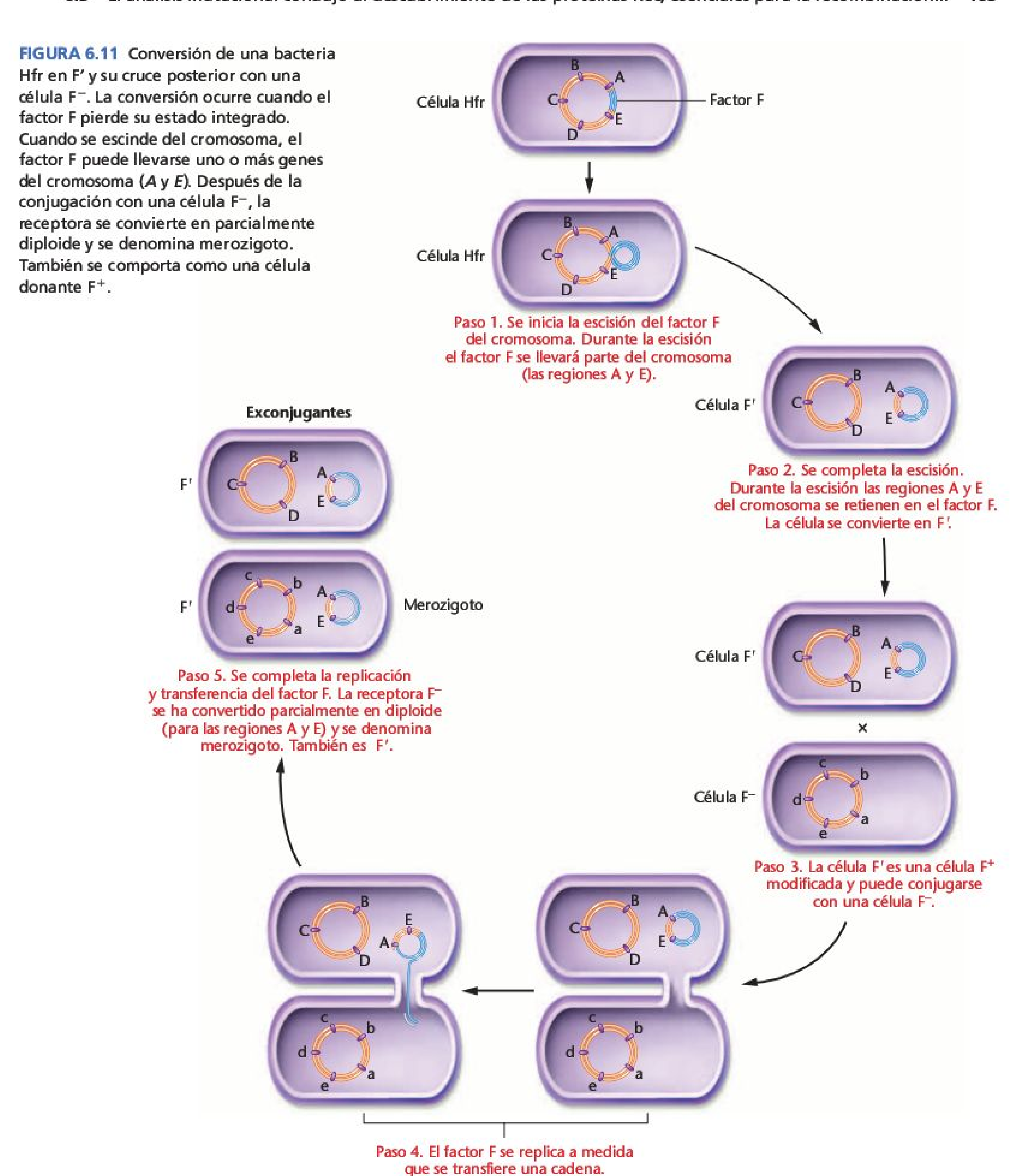


FIGURA 6.11 Conversión de una bacteria Hfr en F′ y su cruce posterior con una célula F^-. La conversión ocurre cuando el factor F pierde su estado integrado. Cuando se escinde del cromosoma, el factor F puede llevarse uno o más genes del cromosoma (*A* y *E*). Después de la conjugación con una célula F^-, la receptora se convierte en parcialmente diploide y se denomina merozigoto. También se comporta como una célula donante F^+.

proteína juega un papel importante en la recombinación en relación bien con una cadena del DNA, o con el extremo lineal de una molécula de DNA de doble cadena que se ha desespiralizado. A medida que se produce, el **desplazamiento de cadena sencilla** es una forma normal de recombinación en muchas especies bacterianas. Cuando el DNA de doble cadena entra en la célula receptora, a menudo se degrada una cadena, dejando a la cadena complementaria como la única fuente de

recombinación. Esta cadena debe encontrar a su región homóloga a lo largo del cromosoma del huésped, y una vez que lo ha conseguido, RecA facilita la recombinación.

El segundo es una proteína más compleja, denominada **proteína RecBCD**, una enzima que consta de subunidades polipeptídicas codificadas por los otros tres genes *rec*. Esta proteína es importante cuando un DNA de doble cadena sirve como base de la recombinación. RecBCD desenrolla la hélice, facilitando la recombinación en la que está implicada RecA. Esta investigación genética ha ampliado considerablemente nuestro conocimiento del proceso de recombinación y subraya la importancia de aislar mutaciones y determinar sus fenotipos para averiguar el papel biológico del gen normal.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos qué productos génicos específicos, como los codificados por los genes recA, están implicados en la recombinación?

6.4 Los factores F son plásmidos

En la sección anterior, hemos examinado la unidad hereditaria extracromosómica denominada factor F. Cuando se encuentra autónomo en el citoplasma bacteriano, esta compuesto por una molécula de DNA de doble cadena circular cerrada. Estas características sitúan al factor F en una categoría más general de estructuras genéticas llamadas **plásmidos**. Estas estructuras [Figura 6.12(a)] pueden tener uno o más genes —a menudo, muy pocos. Su replicación depende de las mismas enzimas que replican al cromosoma de la célula huésped, y en la división celular se distribuyen a las células hijas juntamente con el cromosoma huésped.

Los plásmidos se pueden clasificar de acuerdo con la información genética especificada por su DNA. El factor F confiere fertilidad y tiene genes esenciales para la formación de los pili sexuales, de los que depende la conjugación y posterior recombinación. Los plásmidos **R** y **Col** son otros ejemplos.

La mayoría de los plásmidos R constan de dos componentes: el **factor de transferencia de resistencia (RTF)** y uno o más **determinantes r** [Figura 6.12(b)]. El RTF codifica información genética esencial para la transferencia de los plásmidos entre las bacterias vía conjugación, y los determinantes r son genes que confieren resistencia a antibióticos. Mientras que los RTF son muy similares en una serie de plásmidos de diferentes especies bacterianas, hay una gran variedad de determinantes r, cada uno de los cuales es específico para la resistencia a un tipo de antibiótico. A veces una célula bacteriana tiene plásmidos con determinantes r, pero no hay RTF. Tal célula es resistente, pero no puede transferir información genética para la resistencia a las células receptoras. Sin embargo, los plásmidos estudiados más corrientes constan tanto de RTF como de uno o más determinantes r, que les confiere resistencia a la tetraciclina, estreptomicina, ampicilina, sulfonamida, kanamicina o cloranfenicol. A veces todos estos se encuentran en un solo plásmido, confiriendo resistencia múltiple a varios antibióticos [Figura 6.12(b)]. Las bacterias que llevan dichos plásmidos tienen una gran importancia clínica, no sólo por su resistencia múltiple, sino también debido a lo fácilmente que estos plásmidos pueden transferirse a otras bacterias patógenas, haciéndolas resistentes a una amplia gama de antibióticos.

El **plásmido Col**, ColE1, derivado de *E. coli*, es claramente distinto de los plásmidos R. Codifica una o más proteínas que son altamente tóxicas a cepas bacterianas que no lleven el mismo plásmido. Estas proteínas, llamadas **colicinas**, pueden matar a las bacterias vecinas. Aquellas que llevan el plásmido se dice que son colicinogénicas. El plásmido, presente en 10 a 20 copias por célula, también tiene un gen que codifica a una proteína inmunitaria que protege de la toxina a la célula huésped. A diferencia de los plásmidos R, los plásmidos Col no son transmisibles a otras células por conjugación.

El interés por lo plásmidos ha aumentado enormemente debido a su papel en la tecnología del DNA recombinante, a la que volveremos en el Capítulo 19. En un plásmido se pueden insertar genes específicos de cualquier origen, el cual puede insertarse después artificialmente en una célula bacteriana. Cuando la célula alterada replica su DNA y sufre división, el gen foráneo también se replica, clonándose así los genes.

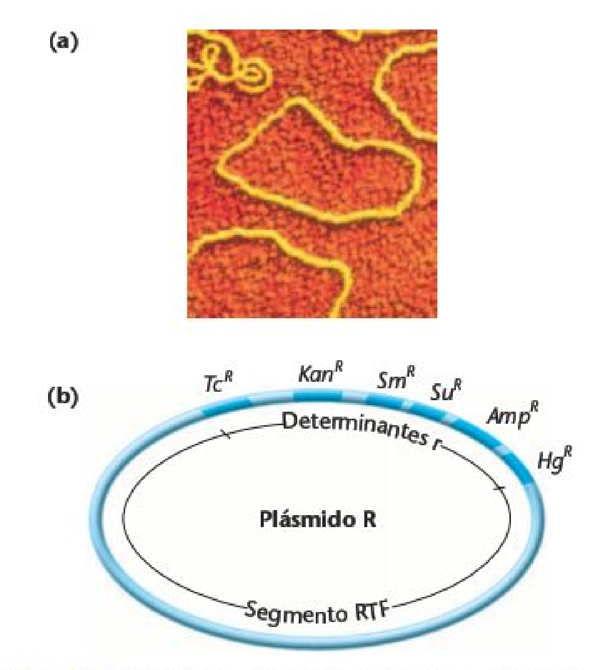


FIGURA 6.12 (a) Micrografía electrónica de un plásmido aislado de *E. coli*. (b) Representación esquemática de un plásmido R con factores de resistencia transferentes (RTF) y múltiples determinantes r (Tc, tetraciclina; Km, canamicina; Sm, estreptomicina; Su, sulfonamida; Ap, ampicilina; y Hg, mercurio).

6.5 La transformación es otro proceso que da lugar a recombinación en bacterias

La **transformación** es un proceso que también proporciona un mecanismo para la recombinación de la información genética en algunas bacterias. En la transformación, trozos pequeños de DNA extracelular se incorporan en una bacteria viva, dando lugar finalmente a un cambio genético estable en la célula receptora. En este capítulo estamos muy interesados en la transformación debido a que, en aquellas especies bacterianas en que ocurre, el proceso se puede utilizar para cartografiar genes bacterianos (aunque de un modo más limitado que la conjugación). Como veremos en el Capítulo 10, la transformación fue también un instrumento para establecer que el DNA es el material genético.

El proceso de la transformación

La transformación que da lugar a recombinación (ilustrada en una serie de pasos en la Figura 6.13) consta de numerosos pasos que finalizan en dos resultados básicos: la entrada de DNA foráneo en la célula receptora y la sustitución por el DNA donante de la región homóloga del cromosoma de la receptora. Mientras que el cumplimiento de ambos resultados da lugar a recombinación, el primer paso de la transformación se puede dar sin el segundo, lo que resulta en la adición de DNA foráneo al citoplasma bacteriano.

Comencemos con el primer resultado. En una población de células bacterianas, sólo aquellas que se encuentran en un estado fisiológico particular, denominado **estado competente**, aceptan el DNA. Se cree que la entrada tiene lugar a través de un número limitado de lugares receptores de la superficie de la célula bacteriana (pasos 1-2) y requiere energía y moléculas transportadoras específicas. Este modelo viene apoyado por el hecho de que las sustancias que inhiben la producción de energía o la síntesis proteica también inhiben la transformación.

Después de la entrada en una célula competente, una de las dos cadenas de la molécula de DNA invasora se digiere por nucleasas, dejando sólo una cadena que participa en la transformación (paso 3). La cadena de DNA no digerida se alinea entonces con la región complementaria del cromosoma bacteriano. En un proceso que implica a varias enzimas, este segmento de DNA sustituye a la región homóloga del cromosoma, que es escindida y degradada (paso 4).

Para que la recombinación se detecte, el DNA transformante debe provenir de una cepa bacteriana diferente, con algunas variantes genéticas. Una vez integrada en el cromosoma, la región recombinante tiene una cadena huésped (presente originalmente) y otra del DNA mutante. Debido a que estas cadenas tienen orígenes distintos, esta región de la doble hélice se denomina **heterodúplex** y las dos cadenas del DNA no son perfectamente complementarias en esta región. Después de una ronda de replicación, un cromosoma se restaura a su secuencia del DNA original, idéntica ala de la célula receptora, y la otra contiene el gen mutante. Después de la división celular, se produce una célula no mutante (no transformada) y una mutante (transformada) (paso 5).

Transformación y genes ligados

Para que el DNA sea efectivo en la transformación debe tener entre 10.000 y 20.000 pares de nucleótidos, alrededor del 1/200 del cromosoma de *E. coli*. Este tamaño es suficiente para codificar varios genes. Genes que son adyacentes o están muy próximos en el cromosoma bacteriano, se pueden encontrar en un fragmento de DNA de dicho tamaño. Debido a ello, una transformación puede dar lugar a la **cotransformación** simultánea de varios genes. Los genes que están lo suficientemente próximos para ser cotransformados se dice que están *ligados*. Adviérta que aquí el término *ligamiento* se refiere a la proximidad de los genes, en contraste con el uso de este término en eucariotas, que se refiere a todos los genes que se encuentran en un cromosoma.

Si dos genes no están ligados, puede darse una transformación simultánea sólo como consecuencia de dos fenómenos de transformación independientes que impliquen a dos segmentos distintos de DNA. Como en el caso del doble entrecruzamiento en eucariotas, la probabilidad de que dos sucesos independientes ocurran simultáneamente es igual al producto de la probabilidad de cada uno. Así, la frecuencia de que dos genes no ligados se transformen simultáneamente es mucho menor que si estuvieran ligados.

Además de establecer relaciones de ligamiento, también se puede determinar la distancia de mapa relativa entre genes ligados a partir de los datos de recombinación proporcionados por experimentos de transformación. Aunque el análisis es más complejo, tales datos se interpretan de manera similar a los mapas de cromosomas en eucariotas.

Ahora resuelva esto

El Problema 6.8 de la página 182 implica la comprensión de cómo se puede utilizar la transformación para determinar si los genes bacterianos están «ligados» muy próximos entre si.

Sugerencia: La cotransformación se produce de acuerdo con las leyes de la probabilidad. Dos genes «no ligados» se transforman como resultado de dos sucesos independientes. En tal caso, la probabilidad de que ocurra es igual al producto de las probabilidades individuales.

Seminario Web 6.2
Genética de fagos

6.6 Los bacteriófagos son virus bacterianos

Los **bacteriofagos**, o **fagos**, como normalmente se les conoce, son virus que parasitan bacterias. Durante su reproducción los fagos se pueden implicar en otro modo de recombinación en

FIGURA 6.13 Pasos propuestos que dan lugar a la transformación de una bacteria por un DNA exógeno. Sólo una de las dos cadenas del DNA que ha entrado está implicada en la transformación, que se completa después de la división celular.

Bacteria competente
Lugar receptor
DNA transformante (de doble cadena)
Cromosoma bacteriano
Se inicia la entrada del DNA

Paso 1. El DNA extracelular se une a la célula competente en el lugar receptor.

Paso 2. El DNA penetra en la célula y las cadenas se separan.

Cadena transformante
Cadena degradada

Paso 3. Una cadena del DNA transformante se degrada; la otra cadena se empareja de manera homóloga con el DNA de la célula huésped.

Heterodúplex

Paso 4. El DNA transformante se recombina con el cromosoma huésped, reemplazando a su región homóloga, formando un heterodúplex.

Célula transformada
Célula no transformada

Paso 5. Después de una ronda de división celular se ha producido una célula transformada y otra no transformada.

bacterias llamada transducción. Para entender este proceso, tenemos que considerar primero la genética de los bacteriófagos, ya que ellos mismos pueden sufrir recombinación. En esta sección examinaremos primero la estructura y el ciclo biológico de un tipo de bacteriófago. Luego discutiremos como se estudian estos fagos cuando infectan bacterias. Finalmente, contrastaremos dos posibles modos de comportamiento una vez se ha iniciado la infección del fago. Esta información servirá de base para nuestra discusión posterior de la transducción y de la recombinación en los bacteriófagos. Utilizando bacteriófagos como sistema modelo, se ha llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones genéticas.

Fago T4: estructura y ciclo biológico.

El bacteriófago T4 pertenece a un grupo de virus bacterianos relacionados, denominados como fagos T-pares. Presenta una estructura compleja, como se muestra en la Figura 6.14. Su material genético, el DNA, se encuentra dentro de una cubierta proteica icosaédrica (un poliedro de 20 caras) que constituye la cabeza del virus. Hay suficiente cantidad de DNA como para codificar más de 150 genes de tamaño medio. La cabeza esta conectada a una cola que tiene un collar y una vaina contráctil que rodea a un eje central. De la cola salen fibras, que tienen en sus extremos lugares de unión que reconocen específicamente áreas concretas de la superficie externa de la pared celular de la bacteria huésped *E. coli*.

El ciclo biológico del fago T4 (Figura 6.15) se inicia cuando el virus se une por adsorción a la célula huésped bacteriana. Luego, una contracción de la vaina de la cola, con gasto de ATP, da lugar a que el eje central penetre en la pared celular. El DNA de la cabeza se inyecta, pasando por la membrana celular hacia el citoplasma bacteriano. Al cabo de unos minutos, se inhibe todo el DNA, RNA y síntesis de proteínas y comienza la síntesis de las moléculas víricas. Al mismo tiempo se inicia la degradación del DNA del huésped.

La infección se caracteriza por un periodo de intensa actividad de los genes del virus. Inicialmente se produce la replicación del DNA del fago, dando lugar a un conjunto de

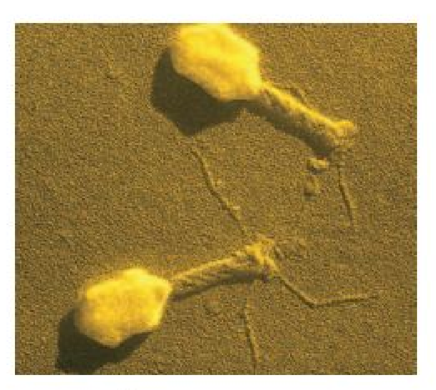




FIGURA 6.14 Estructura del bacteriófago T4, con una cabeza icosaédrica, que se llena de DNA, una cola con un collar, un tubo, una vaina, una placa base y las fibras de la cola. Durante el ensamblaje, los componentes de la cola se añaden a la cabeza y luego las fibras de la cola.

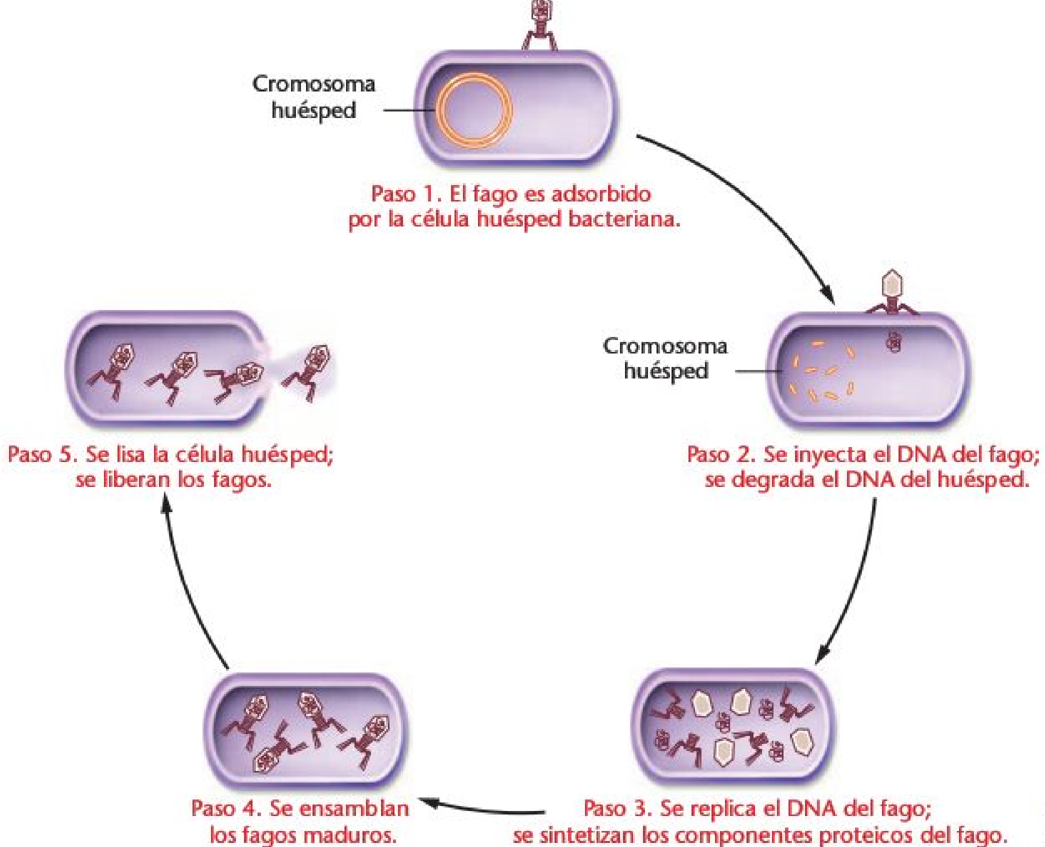


FIGURA 6.15 Ciclo biológico del bacteriófago T4.

moléculas de DNA vírico. Luego se sintetizan los componentes de la cabeza, de la cola y sus fibras. El ensamblaje de los virus maduros es un proceso complejo que ha sido muy bien estudiado por William Wood, Robert Edgar y otros. Se dan tres procesos secuenciales: (1) el DNA se empaqueta cuando se ensamblan las cabezas de los virus, (2) se une la cola y (3) las fibras de la cola. Una vez que el DNA se ha empaquetado en la cabeza, se combina con los componentes de la cola, a la que se añaden las fibras de la cola. La construcción completa es una combinación de autoensamblaje y de procesos dirigidos por enzimas.

Cuando se han construido unos 200 virus, la célula bacteriana se lisa por la acción de la lisozima (un producto de un gen del fago) y los fagos maduros se liberan de la célula huésped. Los nuevos 200 fagos infectarán otras células bacterianas disponibles y el proceso se repetirá una y otra vez.

El análisis de calvas

El estudio experimental del bacteriófago y de otros virus ha jugado un papel importantísimo en nuestra comprensión de la genética molecular. En la infección de bacterias, se pueden obtener cantidades enormes de bacteriófagos para su investigación. A menudo se producen por encima de 10^{10} virus por mililitro de medio de cultivo. Muchos estudios genéticos se basan en nuestra capacidad para determinar el número de fagos producidos después de la infección en condiciones de cultivo específicas. La técnica utilizada se denomina **análisis de calvas**.

Este análisis se ilustra en la Figura 6.16, en donde también se muestra la morfología real de las mismas. Se realiza una dilución seriada de un cultivo puro de bacteriófagos que proviene de un cultivo bacteriano infectado por virus. Se añade a un pequeño volumen de agar nutritivo fundido (alrededor de 3 ml),

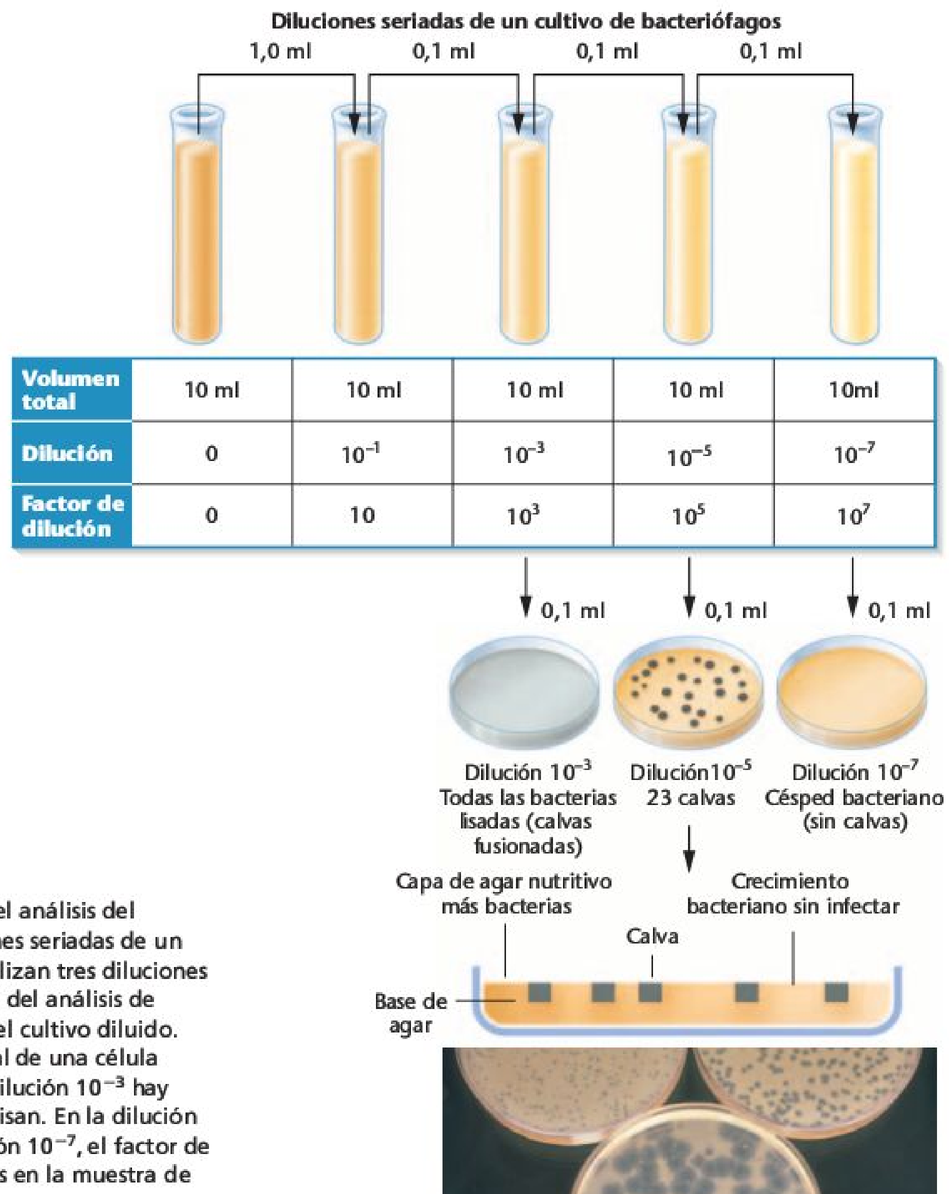


FIGURA 6.16 El ensayo de calvas para el análisis del bacteriófago. Primero se hacen diluciones seriadas de un cultivo con bacteriófagos. Luego se analizan tres diluciones (10^{-3}, 10^{-5} y 10^{-7}) utilizando la técnica del análisis de calvas. En cada caso se utilizan 0,1 ml del cultivo diluido. Cada calva representa la infección inicial de una célula bacteriana por un bacteriófago. En la dilución 10^{-3} hay tantos fagos que todas las bacterias se lisan. En la dilución 10^{-5} se producen 23 calvas. En la dilución 10^{-7}, el factor de dilución es tan grande que no hay fagos en la muestra de 0,1 ml, por lo que no se forman calvas.

que se ha mezclado con unas pocas gotas de un cultivo bacteriano sano, una muestra de 0,1 ml (llamada alícuota) de una o más diluciones. Luego se vierte suavemente la solución sobre una base de agar nutritivo sólido en una placa de Petri y se permite que solidifique. Posteriormente, durante la incubación, las bacterias se reproducen y finalmente cubren todo el disco, formando lo que se llama un césped de células. Sin embargo, allí donde se produce infección por el fago, se forma un área clara llamada **calva**. Las calvas representan lugares en donde un solo fago ha infectado inicialmente a una bacteria durante la incubación. Como el ciclo reproductor del fago se repite numerosas veces (los fagos que se producen de nuevo invaden células bacterianas adyacentes), se lisan más células bacterianas y el tamaño de la calva aumenta. Si el factor de dilución es demasiado bajo, habrá muchos fagos y las calvas serán abundantes. En tales casos, se pueden fusionar, lisando completamente al césped bacteriano. Esto ha ocurrido en la Figura 6.16, con una dilución de 10^{-3}. Por otro lado, si se aumenta el factor de dilución, habrá poco fagos en una alícuota dada y se podrán contar las calvas. De tales datos se puede estimar la densidad de virus en el cultivo inicial, contando las calvas después de la dilución seriada de un cultivo inicial. Por ejemplo, utilizando los resultados que se muestran en la Figura 6.16, se observa que hay 23 calvas de fagos que derivan de una alícuota de 0,1 ml de la dilución 10^{-5}. Esta densidad vírica inicial en la muestra no diluida, en la que se observan 23 calvas en 0,1 ml de la dilución 10^{-5}, se calcula así

$$23 \text{ fagos} \times 10^5/0{,}1 \text{ ml sembrados} = 23 \times 10^6 \text{ fagos/ml}$$

Debido a que este número proviene de la dilución 10^{-5}, es interesante considerar la dilución 10^{-7}, en donde se puede estimar que sólo habría 0,23 fagos por 0,1 ml. Por ello, cuando se comprueben 0,1 ml de este tubo, lo más normal es que no se encuentren partículas víricas. Esta posibilidad se produce en la Figura 6.16, en donde se presenta un césped bacteriano intacto. El factor de dilución es, simplemente, demasiado grande.

La utilización del análisis de calvas ha sido insustituible en estudios mutacionales y de recombinación en bacteriófagos. más tarde aplicaremos está técnica en este capítulo más directamente, cuando se discutan los elegantes análisis genéticos de Seymour Benzer sobre un gen del fago T4.

¿CÓMO LO SABEMOS?

Cuando se examinan bacterias sembradas en un medio en una placa de Petri, ¿cómo sabemos que se ha producido la infección del bacteriófago?

Lisogenia

La relación entre los virus y las bacterias no siempre resulta en la reproducción viral y la lisis. Ya en la década de 1920, se sabía que algunos bacteriófagos podían infectar una célula bacteriana y establecer una relación simbiótica con ella. En la actualidad se entienden bien las bases moleculares concretas de esta simbiosis. Una vez ha entrado, el DNA viral, en lugar de replicarse en el citoplasma bacteriano, se integra en su cromosoma —un paso que caracteriza el estadio de desarrollo denominado **lisogenia**. Posteriormente, cada vez que el cromosoma bacteriano se replica, también es replicado el DNA vírico y pasa a las células hijas con la división. No se producen nuevos virus y no hay lisis de la bacteria. Sin embargo, en respuesta a ciertos estímulos, como tratamiento con sustancias químicas o luz ultravioleta, el DNA vírico puede perder su estado integrado e iniciar la replicación, la reproducción de nuevos fagos y la lisis de la bacteria.

Para describir esta relación se utilizan distintos términos. El DNA vírico, integrado en el cromosoma bacteriano, se denomina **profago**. Los virus que pueden o bien lisar la célula o comportarse como profagos, se denominan **atenuados**. Aquellos que solo pueden lisar a la célula se denominan **virulentos**. Una bacteria que alberga a un profago ha sido **lisogenizada** y se dice que es **lisogénica**; es decir, capaz de ser lisada como consecuencia de la reproducción viral inducida. El DNA vírico que puede replicarse bien extracromosómicamente o como parte del cromosoma bacteriano, a veces se clasifica como **episoma**.

6.7 La transducción es una transferencia de DNA bacteriano a través de un virus

En 1952, Norton Zinder y Joshua Lederberg estaban investigando la posible recombinación en la bacteria *Salmonella typhimurium*. Aunque recuperaron protótrofos de cultivos mixtos de dos cepas auxótrofas diferentes, investigaciones posteriores revelaron que la recombinación no era debida a la presencia de un factor F y a conjugación, como en *E. coli*. Lo que descubrieron era un proceso de recombinación bacteriana a través de bacteriófagos, que ahora llamamos **transducción**.

El experimento de Lederberg-Zinder

Lederberg y Zinder mezclaron las cepas auxótrofas LA-22 y LA-2 de *Salmonella* y recuperaron células protótrofas cuando la mezcla se sembró en un medio mínimo. La LA-22 era incapaz de sintetizar los aminoácidos fenilalanina y triptófano ($phe^- \ trp^-$) y la LA-2 no podía sintetizar los aminoácidos metionina e histidina ($met^- \ his^-$). Se recuperaron protótrofos ($phe^+ \ trp^+ \ met^+ \ his^+$) con una frecuencia de $1/10^5$(o 10^{-5}).

Aunque estas observaciones sugerían al principio que el tipo de recombinación que se daba era el observado anteriormente en las cepas de *E. coli* que se conjugaban, experimentos utilizando el tubo en U de Davis demostraron lo contrario (Figura 6.17). Las dos cepas auxótrofas estaban separadas por un filtro de porcelana, evitando así el contacto celular, pero permitiendo que el crecimiento se diera en un medio común. Sorprendentemente, cuando se extrajeron muestras de ambos

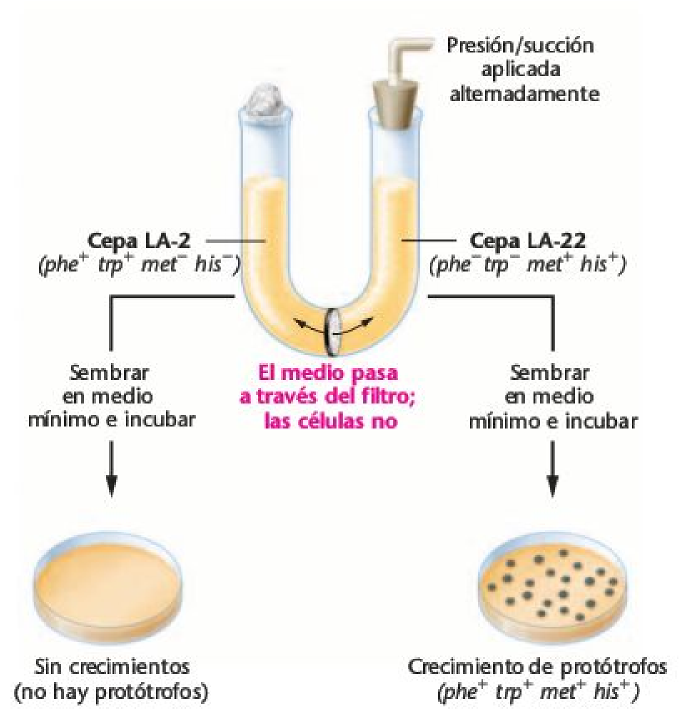


FIGURA 6.17 Experimento de Lederberg-Zinder utilizando *Salmonella*. Después de situar dos cepas auxótrofas en los lados opuestos de un tubo en U de Davis, Lederberg y Zinder recuperaron protótrofos en el lado en el que se encontraba la cepa LA-22, pero no en el lado que contenía la LA-2. Esta observación condujo al descubrimiento del fenómeno denominado transducción.

lados del filtro y se sembraron independientemente en medios mínimos, se recuperaron protótrofos, pero sólo del lado del tubo que tenía las bacterias LA-22. Recuerde que si la conjugación fuera la responsable, usando el tubo en U de Davis se esperaría que se hubiera evitado la recombinación. (Véase la Figura 6.4.)

Ya que las células LA-2 parecían ser el origen de la nueva información genética (phe^+ y trp^+), cómo dicha información había cruzado el filtro desde las células LA-2 a las células LA-22, permitiendo que se diera la recombinación, era un misterio. Se postuló que una fuente desconocida, llamada un **agente filtrable (AF),** era de alguna manera responsable de transferir la información. Tres observaciones posteriores fueron útiles para identificar el AF:

1. El AF se producía en las células LA-2 sólo cuando se cultivaban en asociación con las células LA-22. Si se cultivaban independientemente células LA-2 y se añadía el medio de dicho cultivo a las células LA-22, no se producía recombinación. Por consiguiente, las células LA-22 jugaban cierto papel en la producción del AF por las células LA-2 y lo hacían sólo cuando las dos compartían un medio común.
2. Al añadir DNasa, que digiere enzimáticamente el DNA desnudo, no hacía ineficaz al AF. Por consiguiente, el AF no era DNA, desechando la transformación.
3. El AF no podía pasar a través del filtro del tubo en U de Davis cuando el tamaño del poro se reducía por debajo del tamaño de los bacteriófagos.

Ayudados por estas observaciones y conocedores de que fagos atenuados podían lisogenizar *Salmonella*, los investigadores propusieron que la recombinación estaba mediatizada por el bacteriófago P-22, presente inicialmente como profago en el cromosoma de las células de *Salmonella* LA-22. Se supuso que, ocasionalmente, los profagos P22 pasaban a la fase lítica, se reproducían y se liberaban por las células LA-22. Siendo este fago mucho más pequeño que un bacteria, cruzaba el filtro del tubo en U y posteriormente infectaba y lisaba algunas células LA-2. En el proceso de lisis de la LA-2, los fagos P22 empaquetaban ocasionalmente en sus cabezas una región del cromosoma LA-2. Si esta región contenía los genes phe^+ y trp^+, y si los fagos que posteriormente pasaban a través del filtro, infectaban a las células LA-22, estas nuevas células lisogenizadas se comportarían como protótrofas. El proceso de transducción, mediante el cual se produce recombinación bacteriana a través de un bacteriófago se esquematiza en la Figura 6.18.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que el contacto entre células no es esencial para la transducción?

Naturaleza de la transducción

Nuevos estudios revelaron la existencia de **fagos transductores** en otras especies de bacterias. Por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* pueden presentar transducción por cierto número de fagos. También se han establecido los detalles de diversos modos de transducción. Aun cuando el descubrimiento inicial de la transducción implicaba a fagos atenuados y bacterias lisogénicas, el mismo proceso puede ocurrir en un ciclo lítico normal (infección y lisis). A veces, durante la llamada **transducción especializada**, una pequeña pieza del DNA bacteriano se empaqueta junto con el cromosoma vírico. En tales casos, en el fago transductor sólo hay unos pocos genes bacterianos específicos. En otros casos, la llamada **transducción generalizada**, el DNA del fago se excluye completamente y sólo se empaqueta DNA bacteriano. Fragmentos hasta del 1 por ciento del cromosoma bacteriano pueden quedar englobados en la cabeza vírica. En ambos tipos de transducción, la capacidad de infectar a la célula huésped no queda afectada por la presencia de DNA foráneo.

Durante la transducción generalizada, cuando se inyecta en la bacteria DNA bacteriano en lugar del DNA vírico, este puede quedar en el citoplasma o recombinar con la región homóloga del cromosoma bacteriano. Si el DNA bacteriano permanece en el citoplasma no se replicará, pero se transmitirá a una de las células de la descendencia después de cada división. Cuando

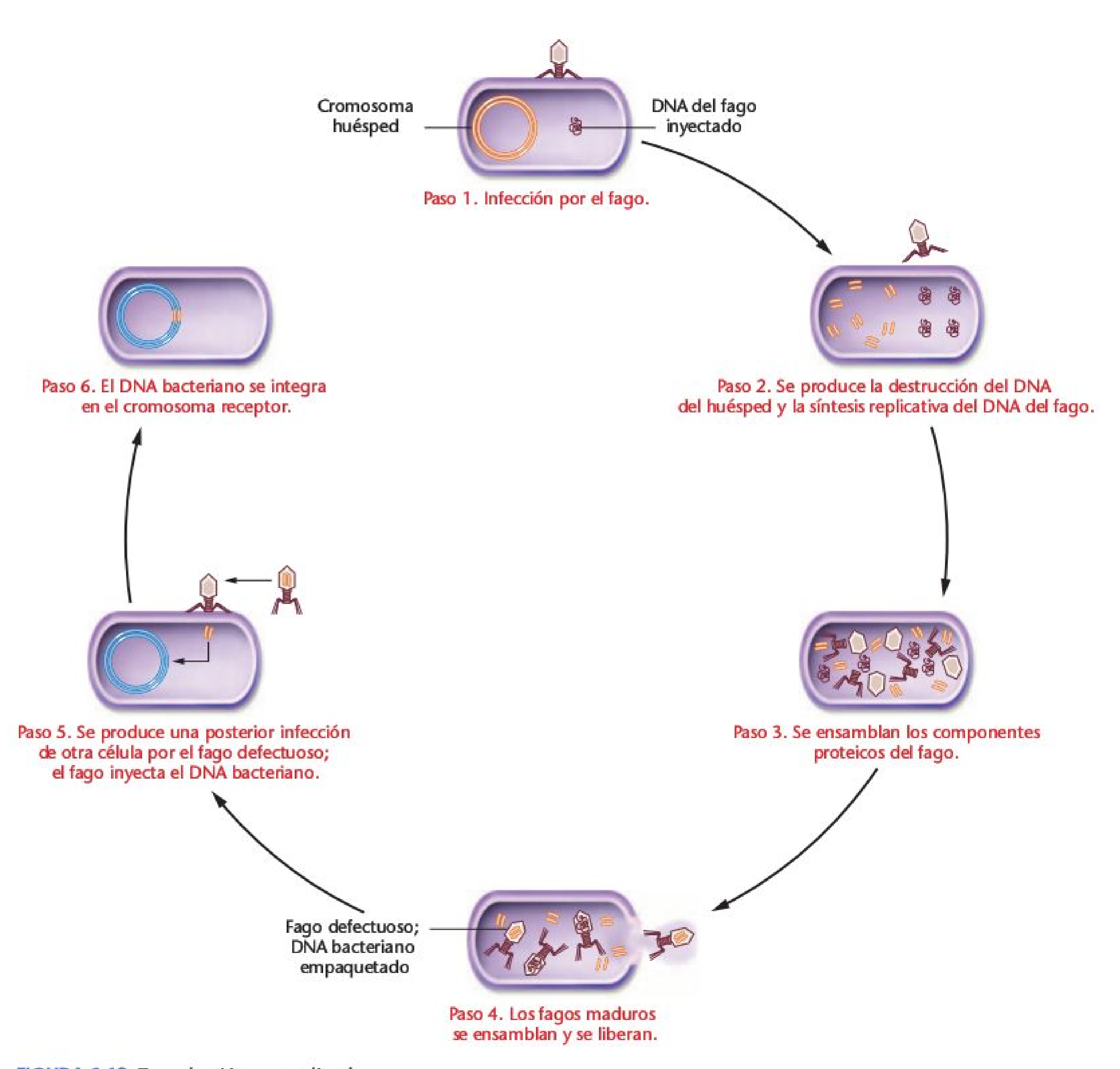


FIGURA 6.18 Transducción generalizada.

esto sucede, se produce sólo una célula, parcialmente diploide para los genes transducidos —fenómeno que se denomina **transducción abortiva**. Si el DNA bacteriano se recombina con la región homóloga del cromosoma bacteriano, los genes transducidos se replican con el cromosoma y pasan a todas las células hijas. Este proceso se denomina **transducción completa**.

Tanto la transducción abortiva como la completa se caracterizan por la naturaleza aleatoria de los fragmentos de DNA y de los genes que se transducen. Cada fragmento del cromosoma bacteriano tiene una probabilidad finita, pero pequeña, de ser empaquetada en la cabeza del fago. La mayoría de los casos de transducción generalizada son del tipo abortivo; algunos datos sugieren que la transducción completa ocurre con una frecuencia de 10 a 20 veces menor.

Transducción y mapas

Como en el caso de la transformación, la transducción generalizada se utilizó para estudios de ligamiento y cartografía del cromosoma bacteriano. El fragmento de DNA bacteriano implicado en una transducción es lo bastante grande como para incluir numerosos genes. Por ello, dos genes que estén próximos en el cromosoma bacteriano (es decir, ligados) se pueden transducir simultáneamente, proceso denominado **cotransducción**. Dos genes que no estén lo suficientemente próximos

como para quedar incluidos en un solo fragmento de DNA, requerirán dos sucesos independientes a fin de transducirse a una sola célula. Ya que esto ocurre con una probabilidad muchísimo menor, se puede determinar el ligamiento.

Concentrándose en dos o tres genes ligados, los estudios de transducción pueden también determinar el orden preciso de estos genes. Cuanto más íntimamente ligados estén los genes, mayor será la frecuencia de cotransducción. Se pueden realizar estudios de cartografía para tres genes próximos. Tal análisis se basa en la misma lógica aplicada a otras técnicas de cartografía.

6.8 Los bacteriófagos sufren recombinación intergénica

En 1947, varios grupos de investigación demostraron que se puede detectar recombinación entre bacteriófagos. Esto condujo al descubrimiento de que se podían realizar mapas de genes en estos virus. Tales estudios dependen de que se encuentren muchas mutaciones en los fagos que puedan visualizarse o analizarse. Como en bacterias y en eucariotas, estas mutaciones permiten la identificación de genes y su seguimiento en experimentos de cartografía. Antes de considerar la recombinación y los mapas en estos virus bacterianos, introduciremos brevemente algunas de las mutaciones que se estudiaron.

Las mutaciones de los fagos afectan a menudo a la morfología de las calvas que se forman después de la lísis de las células bacterianas. Por ejemplo, Alfred Hershey observó en 1946 calvas anormales T2 en placas con la cepa B de *E. coli*. Mientras que las calvas normales T2 son pequeñas y tienen un centro claro rodeado por un halo difuso (casi invisible), la calva anormal era más grande y poseía un perímetro exterior más definido (Figura 6.19). Cuando se aislaron virus de estas calvas y se resembraron en células de *E. coli B*, se advirtió la aparición de calvas idénticas. Así, el fenotipo de la calva era un carácter hereditario que daba lugar a la reproducción de fagos mutantes. Hershey denominó al mutante de *lisis rápida (r)* porque las calvas eran más grandes y aparentemente resultaban de un ciclo biológico del fago más rápido y eficiente. Se sabe ahora que los fagos de tipo silvestre sufren inhibición de su reproducción una vez se ha formado una calva de tamaño dado. El mutante *r* de los fagos T2 es capaz de superar esta inhibición, dando lugar a calvas más grandes.

Salvador Luria descubrió otra mutación del bacteriófago, el *rango de hospedador* (*h*). Esta mutación amplía el rango de los huéspedes bacterianos que el fago puede infectar. Aunque los fagos T2 de tipo silvestre pueden infectar a *E. coli* B, normalmente no pueden atacar o ser adsorbidos en la superficie de *E. coli* B-2. Sin embargo, la mutación *h* proporciona la base para la adsorción y posterior infección de *E. coli* B-2. Cuando crece en un cultivo mixto de *E. coli* B y B-2, el centro de la calva *h* aparece mucho más oscura que la calva h^+ (Figura 6.19).

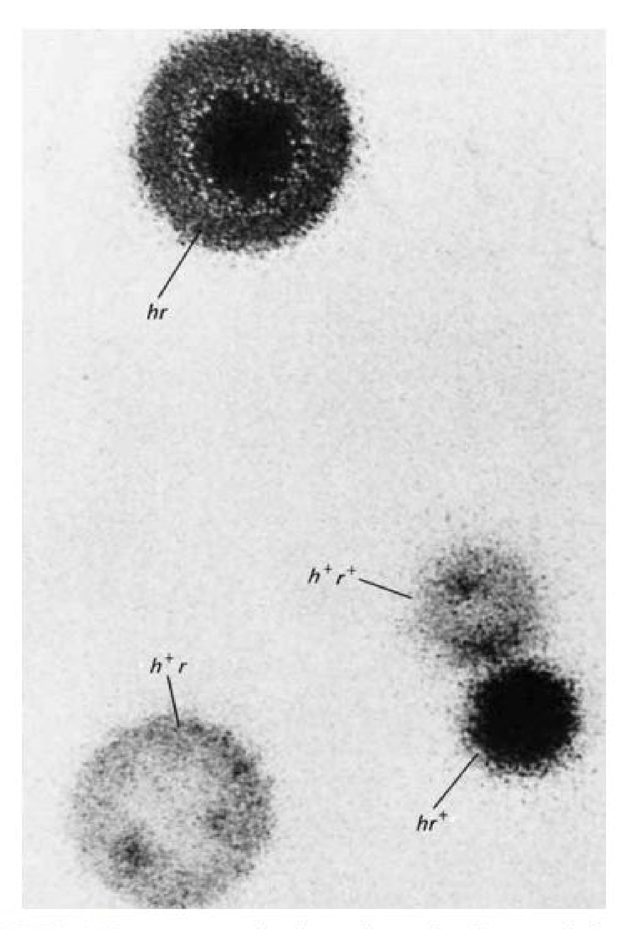


FIGURA 6.19 Fenotipos de calvas observadas después de la infección simultánea de *E. coli* por dos cepas del fago T2, h^+r y hr^+. Además de los genotipos paternos, se recuperaron también calvas recombinantes *hr* y h^+r^+.

En la Tabla 6.1 se da una lista de otros tipos de mutaciones que se han aislado en estudios de la serie de bacteriófagos T-pares (p.e., T2, T4, T6). Estas mutaciones son importantes en el estudio de fenómenos genéticos en bacteriófagos.

TABLA 6.1 ALGUNOS TIPOS MUTANTES DE LOS FAGOS T-PARES

Nombre	Descripción
Diminuta	Calvas pequeñas
Túrbida	Calvas túrbidas en *E. coli* B
Estrella	Calvas irregulares
Sensible a *UV*	Altera la sensibilidad a la luz UV
Resistente a la acriflavina	Forma calvas en agar con acriflavina
Choque osmótico	Resiste una rápida dilución en agua destilada
Lisozima	No produce lisozima
Ámbar	Crece en *E. coli* K12, pero no en B
Sensible a la temperatura	Crece a 25°C, pero no a 42°C

Mapas en bacteriófagos

La recombinación en bacteriófagos se descubrió en **experimentos de infecciones mixtas,** en los que se infectó simultáneamente al mismo cultivo bacteriano con dos cepas mutantes distintas. Estos estudios se diseñaron de tal manera que el número de partículas víricas excediera bastante al número de células bacterianas para asegurar la infección simultánea de muchas células por las dos cepas víricas. Debido a que hay dos loci implicados, la recombinación se denomina **intergénica**. Por ejemplo, en un estudio en el que se utilizó el sistema T2/*E. coli*, los virus paternos eran de genotipo h^+r (tipo de rango de huésped silvestre, lisis rápida) o bien hr^+ (rango de huésped ampliado, lisis normal). Si no ocurría recombinación, estos dos genotipos paternos serían la única descendencia esperada de fagos. Sin embargo, se detectaron recombinantes h^+r^+ y hr además de los genotipos paternos (Figura 6.19). Como en eucariotas, el porcentaje de calvas recombinantes dividido por el número total de calvas refleja la distancia relativa de los genes:

$$[(h^+ r^+) + (h\, r)]/\text{calvas totales} \times 100 = \text{frecuencia de recombinación}$$

En la Tabla 6.2 se presentan datos de muestras de los loci *h* y *r*.

Se han llevado a cabo estudios similares de recombinación con un gran número de genes mutantes en una serie de bacteriófagos. Los datos se analizan de manera muy similar a como se hace en los experimentos de cartografía en eucariotas. Son posibles cruces para mapas de dos y de tres puntos, y se calcula el porcentaje de recombinantes en el número total de los fagos descendientes. Este valor es proporcional a la distancia relativa entre dos genes en la molécula de DNA que constituye el cromosoma.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que en los bacteriófagos se producen intercambios intergénicos?

TABLA 6.2 **RESULTADOS DE UN CRUCE ENTRE LOS GENES *h* Y *r* EN EL FAGO T2 ($hr^+ \times h^+r$)**

Genotipo	Calvas	Designación
$h\,r^+$	42	76% de descendientes paternos
h^+r	34	
h^+r^+	12	24% de recombinantes
$h\,r$	12	

Fuente: Datos derivados de Hershey y Rotman, 1949.

La investigación sobre la recombinación en los fagos apoyan un modelo similar al del entrecruzamiento en eucariotas —un proceso de rotura y reunión entre los cromosomas víricos. Va apareciendo un esquema bastante claro de la dinámica de la recombinación viral. Después de la fase temprana de infección, los cromosomas de los fagos comienzan a replicarse. A medida que este estadio progresa, en el citoplasma bacteriano se acumula un conjunto de cromosomas. Si ha ocurrido una doble infección por fagos de dos genotipos, entonces el conjunto de cromosomas constará inicialmente de los dos tipos paternos. El intercambio entre estos dos tipos ocurrirá antes, durante y después de la replicación, dando lugar a cromosomas recombinantes.

En el caso del ejemplo que hemos discutido de $h^+r - hr^+$, se producirán cromosomas recombinados h^+r^+ y hr. Cada uno de estos cromosomas puede sufrir replicación y es libre también de sufrir nuevos intercambios con los otros y con los tipos paternos.

Además, la recombinación no está restringida al intercambio entre dos cromosomas —pueden estar implicados simultáneamente tres o mas. A medida que progresa el desarrollo del fago, los cromosomas son eliminados aleatoriamente del conjunto y empaquetados en la cabeza del fago, formando fagos maduros. Así, se producen genotipos paternos y recombinantes en los fagos descendientes.

Como veremos en la siguiente sección, sistemas de selección muy potentes han hecho posible la detección de recombinación *intragénica* en virus, en donde el intercambio ocurre dentro de un solo gen, como opuesto a la recombinación intergénica, en donde los intercambios se dan entre genes. Tales estudios han conducido al análisis de la estructura fina del gen.

Ahora resuelva esto

El Problema 6.13 de la página 182 implica la comprensión de cómo se realiza un mapa intergénico en bacteriófagos.

Sugerencia: El mapa se basa en la recombinación que se produce durante la infección simultánea de una bacteria por dos o más cepas específicas de bacteriófagos. La probabilidad de recombinación varía directamente con la distancia entre dos genes. Cartografiar en fagos es similar al mapa de tres puntos en eucariotas. Considere a la célula bacteriana como un «heterozigoto» que alberga «cromosomas homólogos».

6.9 En el fago T4 se produce recombinación intragénica

Concluimos este capítulo explicando un ejemplo ingenioso de análisis genético. A principio de la década de 1950, Seymour Benzer emprendió un examen detallado de un locus, el *rII*, del fago T4. Benzer diseñó acertadamente experimentos para re-

cuperar los extremadamente raros recombinantes que aparecen por intercambio intragénico. Tal recombinación es equivalente al entrecruzamiento en eucariotas, pero en este caso, dentro del gen, en lugar de entre dos genes. Benzer demostró que tal recombinación ocurre entre el DNA de bacteriófagos individuales durante la infección simultánea de la bacteria huésped *E. coli*.

El resultado final del trabajo de Benzer fue la obtención de un mapa detallado del locus *rII*. Debido a la información extremadamente detallada proporcionada por su análisis, y debido a que estos experimentos se realizaron décadas antes de que se desarrollaran las técnicas de secuenciación del DNA, las ideas acerca de la estructura interna del gen tuvieron un enorme significado.

El locus *rII* del fago T4

El primer requisito en el análisis genético es el aislamiento de un gran número de mutaciones del gen que va a ser investigado. Los mutantes del locus *rII* dan lugar a calvas diferentes cuando infectan a la cepa B de *E. coli*, permitiendo su fácil identificación. La Figura 6.19 ilustra calvas mutantes *r* comparadas con calvas de tipo silvestre r^+ en fagos T2 relacionados. La técnica de Benzer fue aislar muchos mutantes *rII* independientes —finalmente obtuvo unos 20.000— y realizar estudios de recombinación para obtener un mapa de este locus. Benzer asumió que la mayoría de las mutaciones, debido a que se aislaron aleatoriamente, representaban localizaciones diferentes dentro del locus *rII* y proporcionarían así una amplia base para estudios de cartografía.

La clave de su análisis fue que los fagos mutantes *rII*, aunque podían infectar y lisar *E. coli* B, no podían lisar otra cepa relacionada, la *E. coli* K12(λ)[3]. Sin embargo, los fagos de tipo silvestre pueden lisar tanto a la cepa B como a la K12. Benzer razonó que esta situación le proporcionaba el potencial para un sistema de análisis altamente sensible. Si fagos de dos cepas mutantes diferentes cualesquiera infectaban de manera simultánea a *E. coli* B, cualquier intercambio entre dos lugares mutantes dentro del locus daría lugar a raros recombinantes de tipo silvestre (Figura 6.20). Si entonces se utilizaba la población de fagos, con más del 99,9 por ciento de fagos *rII* y menos del 0,1 por ciento de fagos de tipo silvestre, para infectar la cepa K12, únicamente aquellos recombinantes de tipo silvestre podrían reproducirse con éxito y dar lugar a calvas de tipo silvestre. Este es el punto esencial para recuperar y cuantificar recombinantes muy poco frecuentes.

Utilizando la técnica de diluciones seriadas, Benzer pudo determinar el número total de fagos mutantes *rII* producidos en *E. coli* B y el número total de fagos recombinantes de tipo silvestre que lisan *E. coli* K12. Estos datos proporcionan las bases para calcular la frecuencia de recombinación, un valor proporcional a la distancia entre dos mutaciones que se están estudiando dentro del gen. Como veremos, este diseño experimental fue extraordinariamente sensible. Notablemente, Benzer pudo detectar un fago recombinante de tipo silvestre entre 100 millones de fagos mutantes. Cuando se combina la información de muchos experimentos, es posible obtener un mapa detallado del locus.

Antes de discutir esta técnica, necesitamos describir un importante descubrimiento realizado por Benzer en sus primeras etapas de este análisis, —descubrimiento que llevó al desarrollo de una técnica que se utiliza ampliamente en los laboratorios de genética en la actualidad, la **prueba de complementación**.

[3] La inclusión de (λ) en la designación de K12 indica que esta cepa bacteriana esta lisogenizada por el fago λ. De hecho, esta es la razón por la que los mutantes *rII* no puedan lisar a tal bacteria. Advierta que cuando nos refiramos a esta cepa a partir de ahora, la abreviaremos simplemente como *E. coli* K12.

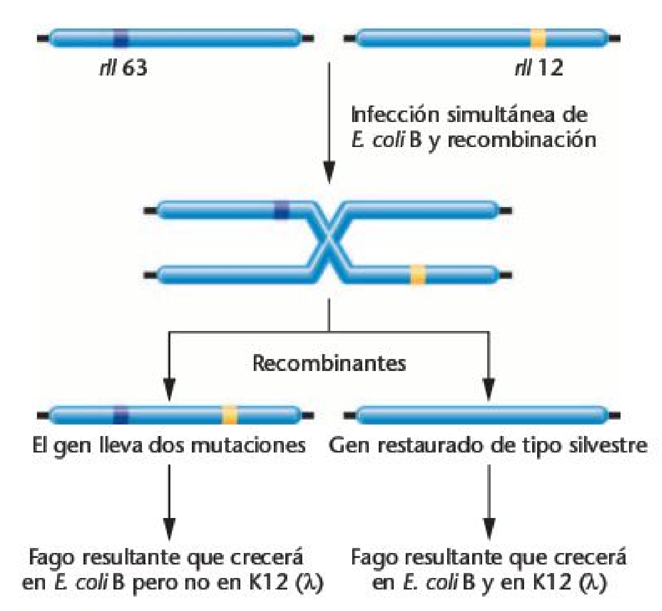


FIGURA 6.20 Esquema de la recombinación intragénica entre dos mutaciones del locus *rII* del fago T4. El resultado es la producción de un fago de tipo silvestre que crecerá tanto en *E. coli* B como en K12 y de otro fago que tendrá ambas mutaciones en el locus *rII*. Crecerá en *E. coli* B, pero no en K12.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo estableció Benzer que se producía recombinación intragénica dentro del locus rII del bacteriófago T4?

Complementación entre mutaciones *rII*

Antes de que Benzer pudiera realizar estudios de recombinación intragénica, tuvo que resolver un problema que se encontró en las primeras etapas de su experimentación. Cuando hacía un control de su experimento en el que infectaba bacterias K12 simultáneamente con pares de cepas mutantes diferentes *rII*, Benzwer encontró a veces que ciertas parejas de cepas mutantes *rII* lisaban bacterias K12. Al principio esto fue muy sorprendente, ya

que se suponía que solo eran capaces de lisar a bacterias K12 los fagos *rII* de tipo silvestre. ¿Cómo podían dos cepas mutantes *rII* presentar una función de tipo silvestre si, tal como se creía, cada una de ellas tenía un defecto en el mismo gen?

Benzer razonó que, durante la infección simultánea, cada cepa mutante proporcionaba a la otra algo de lo que carecía, restaurando así la función de tipo silvestre. Llamó a este fenómeno de **complementación**, lo que se ilustra en la Figura 6.21(a). Cuando se comprobaron muchos pares de mutaciones, cada mutación pertenecía a uno u otro posible **grupo de complementación**, A o B. Aquellas que no se complementaban se situaban en el mismo grupo de complementación, mientras que las que complementaban se asignaban a grupos de complementación diferentes. Benzer acuñó el término **cistrón**, que definió como la unidad genética funcional más pequeña, para describir tales grupos de complementación. En terminología actual sabemos que un cistrón equivale a un gen.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo determinó Benzer que el locus rII se subdividía en dos regiones o cistrones?

Sabemos ahora que los cistrones A y B de Benzer son en realidad dos genes distintos en lo que nosotros denominados originalmente como locus *rII*. La complementación se produce cuando una bacteria K12 se infecta con dos mutantes *rII*, uno de los cuales tiene una mutación en el gen A y el otro en el gen B. Por consiguiente, hay una fuente para ambos productos génicos de tipo silvestre, ya que el mutante A proporciona el producto B de tipo silvestre, y el mutante B proporciona el producto A de tipo silvestre. Podemos también explicar porqué dos cepas que no complementan, es decir, dos mutantes del cistrón A, son

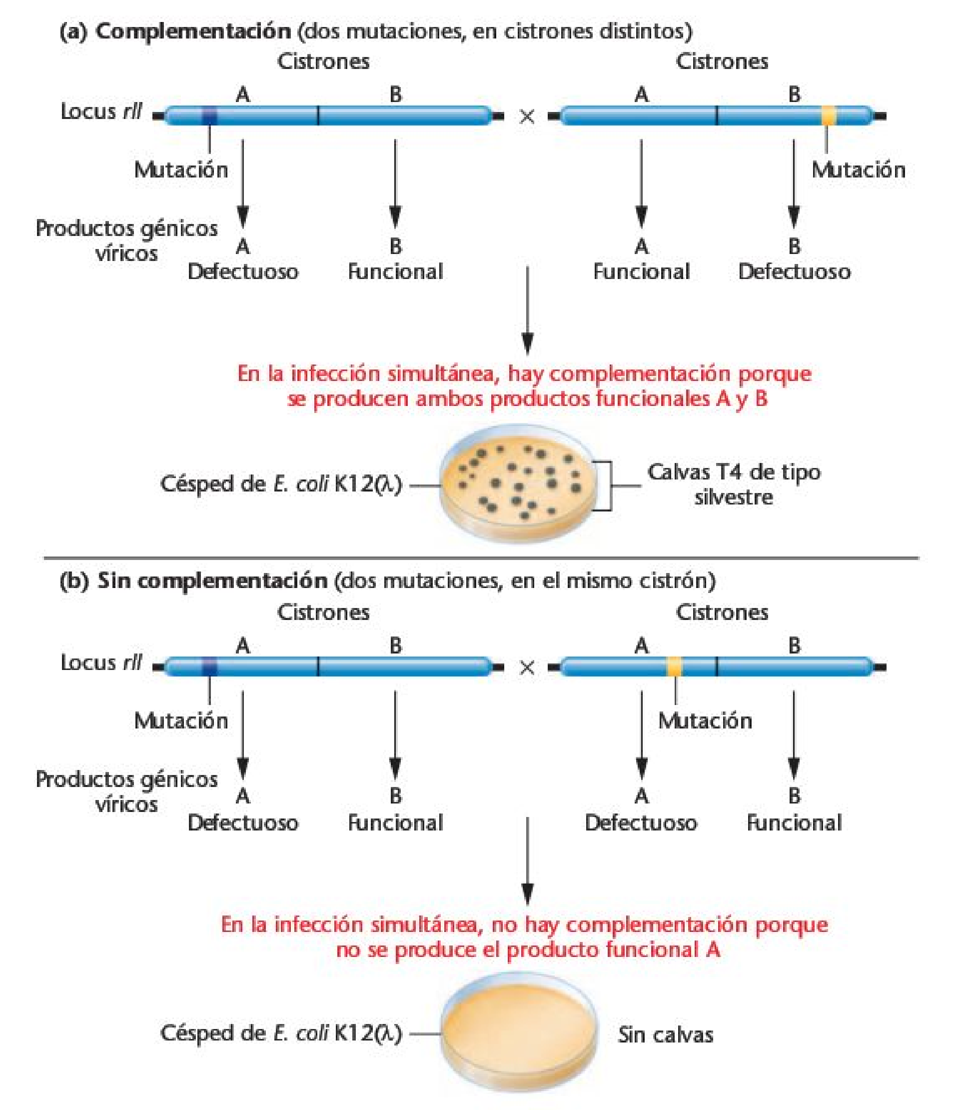


FIGURA 6.21 Comparación de dos mutaciones *rII* que se complementan (a) o no (b). La complementación ocurre cuando cada mutación afecta a un cistrón distinto. La no complementación ocurre si las dos mutaciones afectan al mismo cistrón.

realmente mutaciones en el mismo gen. En este caso, si se combinan dos mutantes del cistrón A, se producirá el producto B de tipo silvestre, pero no el producto A [Figura 6.21(b)].

Una vez que Benzer pudo situar todas las mutaciones *rII* en sus correspondientes cistrones, A o B, pudo volver a sus estudios de recombinación intragénica, comprobando mutaciones del cistrón A entre si, y lo mismo del cistrón B.

Ahora resuelva esto

El Problema 6.18 de la página 182 implica comprender porqué la complementación se produce durante la infección simultánea de una bacteria por dos cepas de bacteriófagos, cada una con mutaciones distintas en el gen *rII*.

Sugerencia: Si cada mutación modifica un producto génico distinto, entonces cada cepa dará lugar al producto que carece la otra, dando lugar a complementación.

Análisis de la recombinación

De las aproximadamente 20.000 mutaciones *rII*, a cada cistrón pertenecía aproximadamente la mitad. Benzer se preparó para cartografiar las mutaciones dentro de cada uno. Por ejemplo, centrándonos inicialmente en el cistrón A, si se infectara un cultivo líquido de *E. coli* B con dos mutantes *rIIA*, y ocurriera una recombinación entre los lugares mutacionales del cistrón A, entonces se produciría una descendencia de virus de tipo silvestre en baja frecuencia. Si luego se sembrara una muestra de los virus de tal experimento en *E. coli* K12, sólo los recombinantes silvestres lisarían las bacterias y formarían calvas. También se determinó el número total de virus descendientes no recombinantes sembrando una muestra en *E. coli* B.

Este protocolo experimental se ilustra en la Figura 6.22. El porcentaje de recombinantes se puede determinar contando las calvas a la dilución apropiada en cada caso. Como en los experimentos de cartografía en eucariotas, la frecuencia de recombinación es una estima de la distancia entre las dos mutaciones dentro del cistrón. Por ejemplo, si el número de recombinantes es igual a 4×10^3/ml y el número total de descendientes es 8×10^9/ml, entonces la frecuencia de recombinación entre los dos mutantes es:

$$2\left(\frac{4 \times 10^3}{8 \times 10^9}\right) = 2(0{,}5 \times 10^{-6})$$
$$= 10^{-6}$$
$$= 0{,}000001$$

Es necesario multiplicar por 2 debido a que cada recombinación da lugar a dos productos recíprocos. Sólo se detecta uno de ellos —el de tipo silvestre.

Ahora resuelva esto

El Problema 6.20 de la página 183 se refiere a la cartografía intragénica dentro de cada cistrón del locus *rII*.

Sugerencia: La recombinación se da dentro del gen de la misma manera que se da entre genes, pero con una frecuencia mucho más reducida.

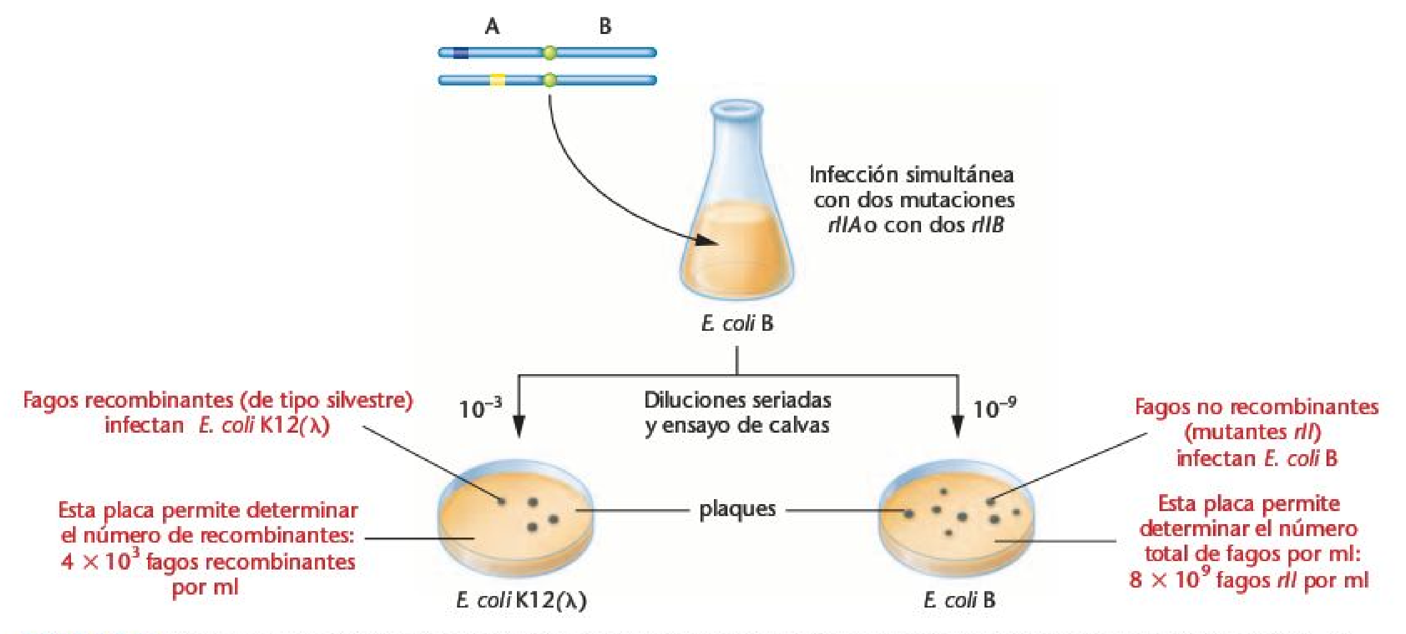


FIGURA 6.22 Protocolo experimental para estudios de recombinación entre una pareja de mutaciones en el mismo cistrón. En esta figura todos los fagos infectan *E. coli* B (en el matraz) que tiene una de las dos mutaciones en el cistrón A, como se indica en el esquema de su cromosoma a la izquierda del matraz.

Prueba de deleciones del locus *rII*

Aunque con el sistema selectivo descrito anteriormente se podían cartografiar mutaciones dentro de cada cistrón, comprobar 1000 mutantes, dos al mismo tiempo, en todas las combinaciones hubiera requerido millones de experimentos. Afortunadamente Benzer pudo soslayar este obstáculo cuando diseñó un enfoque analítico llamado **análisis de deleciones**. Descubrió que algunas de las mutaciones *rII* eran realmente deleciones de pequeños fragmentos en cada cistrón. Es decir, los cambios genéticos que daban lugar a las peculiaridades de *rII* no eran las características mutaciones puntuales. Lo más importante era que cuando una mutación por deleción se probaba en una infección simultánea con una mutación puntual localizada en la parte delecionada del mismo cistrón, nunca producía recombinantes de tipo silvestre. La base de esta incapacidad se ilustra en la Figura 6.23. Ya que el área delecionada carece del DNA que contiene la mutación, no hay recombinación posible. Así, se disponía de un método que permitía localizar aproximada, pero rápidamente, cualquier mutación, a condición de que estuviera dentro de la región que cubría la deleción.

La utilización del análisis de deleciones pudo servir para la localización inicial de cada mutación. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 6.24, se utilizaron siete deleciones solapantes que abarcaban varias regiones de los cistrones A y B para un análisis inicial de mutaciones puntuales. Dependiendo de si un cromosoma vírico con una mutación puntual y un cromosoma con una deleción recombinaran o no, se pudo asignar cada mutación puntual a un área específica de cada cistrón. Luego se pueden utilizar otras deleciones dentro de cada una de las siete áreas, para localizar o cartografiar cada mutación puntual *rII* de manera más precisa. Recuérde que, en cada caso, cada mutación puntual está localizada en el área de una deleción con la que no puede dar lugar a ningún recombinante de tipo silvestre.

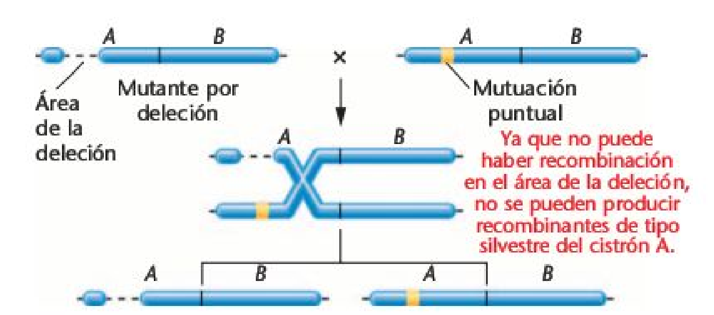


FIGURA 6.23 Demostración de que la recombinación entre el cromosoma de un fago con una deleción en el cistrón A y otro con una mutación puntual que se solapa por la deleción no puede dar lugar a un cromosoma con los cistrones A y B de tipo silvestre.

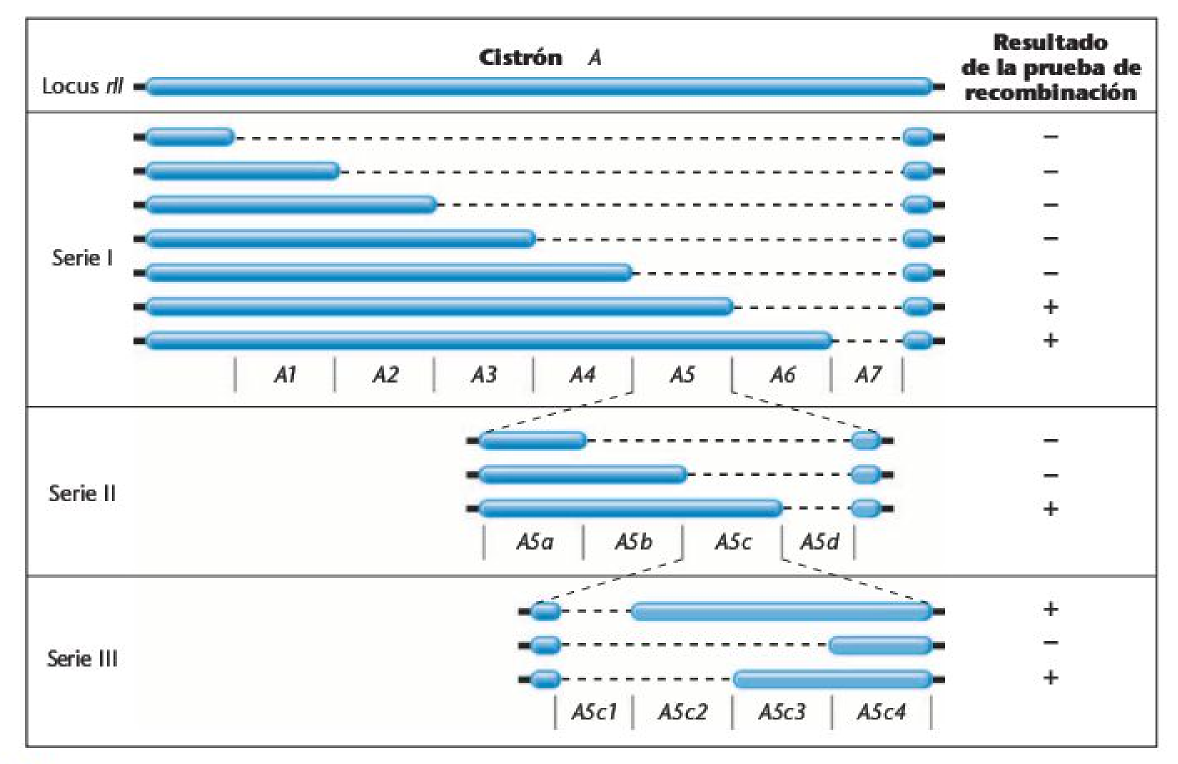


FIGURA 6.24 Tres serie de deleciones solapantes en el cistrón A del locus *rII* utilizadas para localizar la posición de una mutación *rII* desconocida. Por ejemplo, si se prueba una cepa mutante con cada deleción (áreas sombreadas) de la serie I en cuanto a la producción de descendencia recombinante de tipo silvestre y se obtienen los resultados de la derecha (+ o –), la mutación debe de estar en el segmento A5. En la serie II, la mutación se localiza en un segmento más pequeño, el A5c, y en la serie III en el segmento A5c3.

El mapa del gen *rII*

Después de varios años de trabajo, Benzer obtuvo un mapa de los dos cistrones que forman el locus *rII* del fago T4 (Figura 6.25). De las 20.000 mutaciones analizadas, se cartografiaron 307 lugares distintos dentro de este locus. A las áreas que tenían muchas mutaciones se las denominó **puntos calientes,** que aparentemente eran lugares más susceptibles de mutar que lugares en donde se localizaban una o muy pocas mutaciones. Además, Benzer encontró áreas dentro de los cistrones en donde no se localizaron mutaciones. De sus estudios estimó que no se habían localizado hasta unas 200 unidades de recombinación.

El significado del trabajo de Benzer es su aplicación al análisis genético de lo que se había considerado una unidad abstracta —el gen. Benzer demostró en 1955 que un gen no es una partícula indivisible sino que consta de unidades de mutación y de recombinación que están dispuestas en un orden concreto. Actualmente sabemos que estas unidades son los nucleótidos que componen el DNA. Su análisis, realizado antes de los detallados estudios moleculares del gen en la década de 1960, se considera uno de los ejemplos clásicos de experimentación en genética.

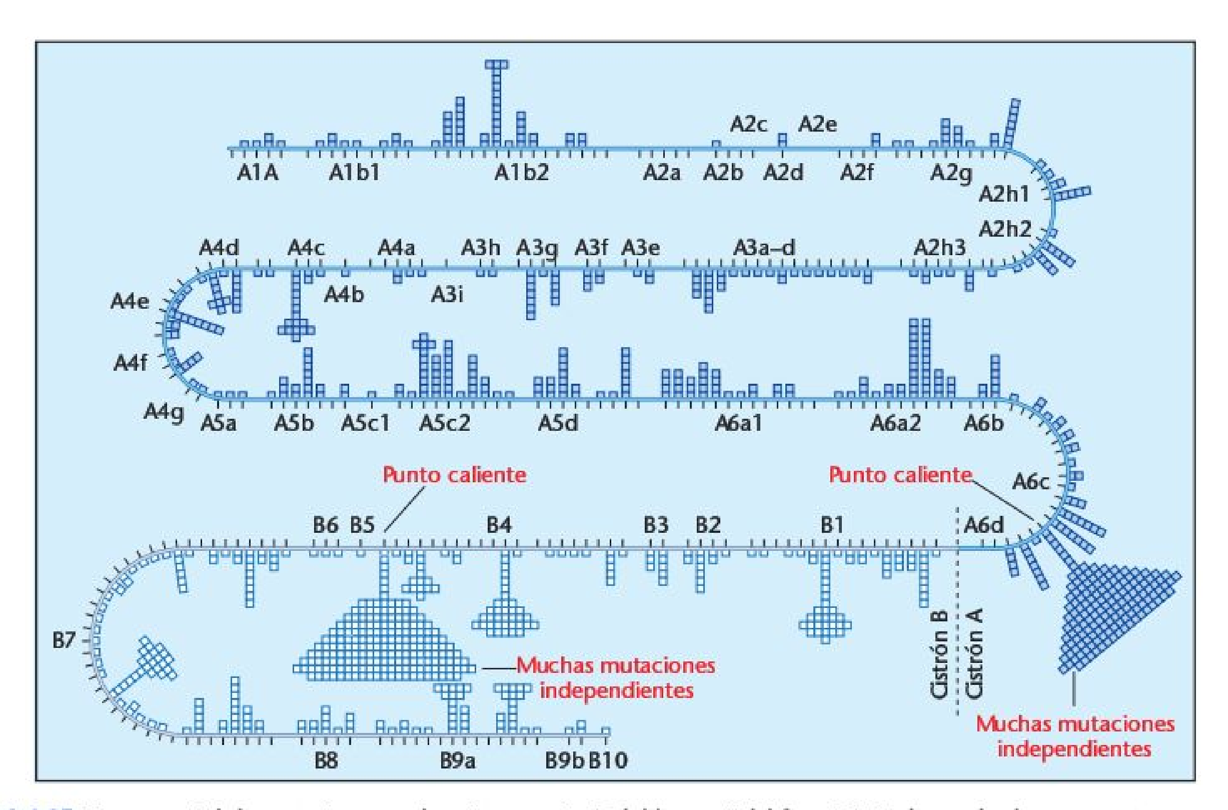
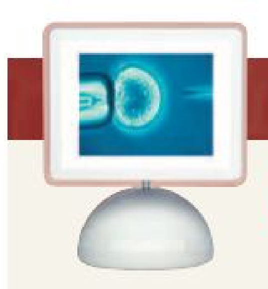


FIGURA 6.25 Mapa parcial de mutaciones en los cistrones A y B del locus *rII* del fago T4. Cada cuadrado representa una mutación aislada independientemente. Advierta los dos puntos en donde se detecta el mayor número de mutaciones, que se denominan «puntos calientes» (A6cd y B5).



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Genes bacterianos y enfermedades: de la expresión génica a las vacunas comestibles

Utilizando una serie ampliada de herramientas de genética molecular, los científicos se están enfrentando a algunas de las enfermedades bacterianas más graves que afectan a nuestra propia especie. Como veremos, nuestra recién adquirida comprensión de los genes bacterianos nos está conduciendo directamente a nuevos tratamientos estimulantes basados en vacunas comestibles. La historia de la vacuna contra el cólera es un modelo de esta investigación.

El agente causal del cólera es el *Vibrio cholerae*, una bacteria curvada, en forma de bastón, que se encuentra fundamentalmente en ríos y océanos. Muchas cepas genéticas de *V. cholerae* no son perjudiciales; sólo unas pocas son patógenas. La infección se produce cuando una persona bebe agua o come alimentos contaminados por el *V. cholerae* patógeno. Cuando llegan al sistema digestivo, estas bacterias colonizan el intestino delgado y producen proteínas llamadas enterotoxinas. La enterotoxina cólera invade las células de la mucosa que tapizan el intestino, provocando una secreción masiva de agua y de sales disueltas de estas células. Esto da lugar a severas diarreas que, si no se tratan, llevan a una grave deshidratación, calambres musculares, letargo y a menudo a la muerte. La enterotoxina consta de dos piolipéptidos, llamados las subunidades A y B, codificadas por dos genes distintos. Para que la toxina sea activa, una subunidad A debe unirse a cinco subunidades B.

El cólera es la primera causa de muerte en bebes y niños del Tercer Mundo, en donde se carece de condiciones sanitarias básicas y el suministro de agua está a menudo contaminado. Por ejemplo, en Julio de 1994 hubo 70.000 casos de cólera entre los ruandeses que atestaban los campos de refugiados en Goma, Zaire, dando lugar a 12.000 fallecimientos. Una epidemia de cólera asoló el África oriental en el otoño de 1997, matando a cerca de 3.000 personas. Y después de una ausencia de casi 100 años, reapareció el cólera en América Latina en 1991, extendiéndose desde Perú a Méjico y reclamando más de 10.000 vidas. En 2001, la Organización Mundial de la Salud informó de más de 40 brotes de cólera en 28 países.

Está apareciendo una nueva tecnología genética para atacar al cólera. Esta tecnología se centra en plantas modificadas genéticamente que actúan como vacunas. Cuando se inserta un gen foráneo en el genoma de una planta, se transcribe y se traduce, se produce una planta transgénica que contiene el producto génico foráneo. La inmunización requiere entonces comer estas plantas. En teoría, la proteína foránea de la planta actúa como antígeno, estimulando la producción de anticuerpos para proteger contra la infección bacteriana. Ya que es la subunidad B de la enterotoxina del cólera la que se une a las células intestinales, la atención se ha centrado en dicho polipéptido como antígeno, razonando que los anticuerpos contra él evitarán la unión de la toxina convirtiendo a las bacterias en no perjudiciales.

Liderando los esfuerzos para desarrollar una vacuna comestible se encuentra Charles Arntzen y asociados de la Universidad de Cornell. Para probar el sistema, Arntzen utiliza la subunidad B de una enterotoxina de *E. coli*, similar en estructura y propiedades inmunológicas a la proteína del cólera. El primer paso fue obtener el clon de DNA del gen que codifica la subunidad B y unirlo a un promotor que induciría su transcripción en todos los tejidos de la planta. Segundo, el gen híbrido se introdujo en plantas de patata mediante la transformación con *Agrobacterium*. Arntzen y sus colegas eligieron la patata porque podían ensayar la efectividad del antígeno en las partes comestibles de la planta, el tubérculo. Los análisis demostraron que las plantas transgénicas expresaban su nuevo gen y producían la subunidad B de la enterotoxina. El tercer paso fue alimentar a ratones con unos pocos gramos de estos tubérculos modificados genéticamente. Arntzen encontró que los ratones producían anticuerpos específicos contra la subunidad B y los segregaban en el intestino delgado. Y, lo más importante, ratones alimentados más tarde con enterotoxina purificada estaban protegidos contra sus efectos y no desarrollaron los síntomas del cólera. Se están realizando ensayos clínicos con sujetos humanos para comprobar la eficacia de la vacuna producida por la patata. En las llevadas a cabo en 1998, casi todos los voluntarios desarrollaron una respuesta inmune, y no experimentaron efectos laterales adversos.

El grupo de Arntzen está también produciendo vacunas comestibles en bananas, que tienen varias ventajas sobre las patatas. Las bananas pueden crecer casi en cualquier parte en países desarrollados tropicales o subtropicales, exactamente en donde las vacunas son más necesarias. A diferencia de las patatas, las bananas normalmente se comen crudas, evitando la inactivación potencial de las proteínas antigénicas por cocción. Finalmente las bananas son apreciadas por los bebés y los niños, haciendo este proceso de inmunización más factible. Si todo va como se ha planeado, puede que algún día sea posible inmunizar a todos los niños del Tercer Mundo contra el cólera y otras enfermedades intestinales, salvando un incalculable número de vidas jóvenes.

El experimento de Arntzen ha servido de modelo para otras investigaciones sobre una serie de enfermedades humanas. Un grupo del John P. Robarts Institute de Ontario, Canadá, ha demostrado que vacunas producidas por las patatas pueden evitar la diabetes juvenil en ratones. Meristem Therapeutics, con base en Francia, realiza ensayos clínicos utilizando maíz adaptado para aliviar los efectos de la fibrosis quística. Un grupo de investigación australiano ha obtenido con éxito plantas de tabaco que tienen una proteína que se encuentra en el virus del sarampión. Después de demostrar la inducción de inmunidad alimentando a ratones con extractos de hojas de tabaco, ha comenzado la comprobación de la vacuna contra el sarampión en primates. Las plantas de tabaco también están siendo usadas para producir la proteína antiviral interleuquina 10, para tratar la enfermedad de Crohn. Esfuerzos similares se llevan a cabo para obtener vacunas contra la rabia, el ántrax, el tétano y el SIDA.

Aunque las vacunas comestibles parece que tienen un futuro prometedor, todavía hay muchos aspectos que deben ser investigados. Un problema ha sido la dosis. Algunas plantas producen muy poco antígeno, mientras que otras producen niveles elevados, que pueden inducir tolerancia en lugar de inmunidad. Hay también aspectos sobre el potencial peligro ambiental de cultivar cosechas transgénicas. En concreto, tienen que tomarse medidas que eviten que los transgenes se introduzcan en poblaciones vegetales nativas. Además, algunos países se oponen por causas morales a los alimentos modificados genéticamente. Si se pueden superar estos obstáculos, las vacunas comestibles cumplirán su gran promesa de aliviar muchas enfermedades humanas.

Referencias

Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D., and Arntzen, C.J. 1995. Oral inmunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-76.

Mason, H.S., Warzecha, H., Mor, T., and Arntzen, C.J. 2002. Edible plant vaccines: Applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 8:324-329.

Webster, D.E. et al. 2002. Appetising solutions: An edible vaccine for measles. *Med. J. Australia* 176:434-437.



RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. La variación fenotípica hereditaria en bacterias puede resultar de mutación espontánea.
2. La recombinación en bacterias se puede realizar de tres modos diferentes en cuanto a la introducción del DNA en la célula receptora: conjugación, transformación y transducción.
3. La conjugación la inicia una bacteria que alberga un plásmido, llamado factor F. Si el factor F se encuentra en el citoplasma de la célula donante (F^+), la célula receptora recibe una copia del factor F, convirtiéndose en F^+.
4. Si el factor F está integrado en el cromosoma de la célula donante (Hfr), la conjugación se inicia con la célula receptora, y el cromosoma donante se desplaza unidireccionalmente a la receptora, dando lugar a recombinación. El mapa por tiempos del cromosoma bacteriano se basa en la localización de cada gen respecto de la orientación y posición del factor F en el cromosoma donante.
5. Los productos de un grupo de genes denominados *rec* están directamente implicados en el proceso de recombinación entre el DNA invasor y el cromosoma de la bacteria receptora.
6. Los plásmidos, como el factor F, son moléculas de DNA que se encuentran en el citoplasma bacteriano y se replican de manera autónoma. Algunos plásmidos pueden tener muchos genes, como los que les confieren resistencia a los antibióticos, además de los que son necesarios para su transferencia durante la conjugación.
7. En el fenómeno de la transformación, que no requiere contacto entre las células, el DNA exógeno se integra en el cromosoma del huésped de una célula bacteriana receptora. Utilizando este proceso se realizan mapas de ligamiento de genes muy próximos.
8. Los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) presentan un ciclo biológico definido, durante el cual se reproducen dentro de la célula huésped. Se pueden estudiar utilizando el ensayo de calvas.
9. Los bacteriófagos pueden ser líticos —es decir, infectan, se reproducen y lisan a la célula huésped— o lisogenizar a la célula huésped, cuando infectan e integran su DNA en el cromosomas del huésped.
10. La transducción es una recombinación bacteriana de DNA mediada por un virus. Cuando una bacteria lisogenizada entra posteriormente en el ciclo lítico, el nuevo bacteriófago sirve de vehículo para la transferencia del DNA (bacteriano) al huésped. En el proceso de transducción generalizada, se transfiere una parte aleatoria del cromosoma bacteriano. En la transducción especializada se transfieren sólo genes específicos adyacentes al punto de inserción del profago en el cromosoma bacteriano.
11. La transducción también se puede usar para estudios de ligamiento y realización de mapas en bacterias.
12. En los bacteriófagos se han estudiado varios fenotipos mutantes, como la morfología de las calvas y la amplitud de huésped. Estos han servido de base para investigar el intercambio genético y los mapas entre estos virus.
13. El análisis genético del locus *rII* del bacteriófago T4 permitió a Seymour Benzer estudiar la recombinación intragénica. Aislando mutantes *rII*, realizando análisis de complementación, estudios de recombinación y mapas por deleción, Benzer pudo localizar y cartografiar más de 300 lugares distintos dentro de los dos cistrones del locus *rII*.

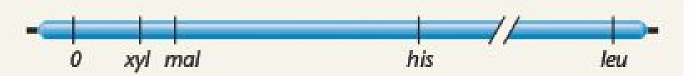
IDEAS Y SOLUCIONES

1. En un cruce, utilizando la técnica de la conjugación interrumpida con los genes *his, leu, mal* y *xyl*, se realizó un mapa por tiempos. Las células receptoras eran auxótrofas para los cuatro genes. Después de 25 minutos se interrumpió el cruce con los siguientes resultados en las células receptoras.

(a) 90% eran xyl^+
(b) 80% eran mal^+
(c) 20% eran his^+
(d) ninguna era leu^+

¿Cuál es la posición de estos genes respecto del origen (*O*) del factor F y entre sí?

Solución: Debido a que el gen *xyl* se transfirió con mayor frecuencia, es el más próximo a *O* (muy cercano). El gen *mal* es el siguiente y razonablemente próximo a *xyl*, seguido del gen *his*. El gen *leu* se encuentra más alejado de estos tres, ya que no hay recombinantes recuperados que lo incluyan. El esquema posterior ilustra estas posiciones relativas a lo largo de un segmento del cromosoma circular:

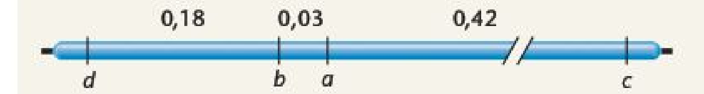


2. En un experimento de transformación se utilizaron como fuente de DNA donante tres cepas bacterianas, cada una de ellas con una de las mutaciones a^-, b^- y c^-, siendo las células receptoras de tipo silvestre para dichos genes, pero expresando el mutante d^-.

(a) Basándose en los siguientes datos, y suponiendo que la localización del gen *d* precede a los genes *a*, *b* y *c*, proponga un mapa de ligamiento para los cuatro genes.

DNA donante	Recipiente	Transformantes	Frecuencia de transformantes
a^-d^+	a^+d^-	a^+d^+	0,21
b^-d^+	b^+d^-	b^+d^+	0,18
c^-d^+	c^+d^-	c^+d^+	0,63

Solución: Estos datos reflejan las distancias relativas entre cada uno de los genes *a*, *b* y *c* y el gen *d*. Los genes *a* y *b* están aproximadamente a la misma distancia del gen *d* e íntimamente ligados. El gen *c* se encuentra más alejado. Asumiendo que el *d* precede a los otros, el mapa es como sigue:



(b) Si el DNA donante fuera de tipo silvestre y las células receptoras fueran a^-b^-, a^-c^- o b^-c^-, ¿en que caso se esperaría encontrar transformantes de tipo silvestre con mayor frecuencia?

Solución: Debido a que los genes a y b están íntimamente ligados, serán cotransformados con mayor probabilidad en un cruce dado. Así, es más probable que las células receptoras a^-b^- se conviertan al tipo silvestre.

3. En cuatro cepas de bacterias Hfr, todas ellas originadas de un cultivo F^+ mantenidp durante varios meses, se estudió un hipotético grupo de genes y se demostró que se transferían en el siguiente orden:

Cepa Hfr	Orden de transferencia					
1	*E*	*R*	*I*	*U*	*M*	*B*
2	*U*	*M*	*B*	*A*	*C*	*T*
3	*C*	*T*	*E*	*R*	*I*	*U*
4	*R*	*E*	*T*	*C*	*A*	*B*

Asumiendo que *B* es el primer gen en el cromosoma, determinar la secuencia de todos los genes presentados. Una cepa originó un dilema aparente. ¿Cuál fue? Explique porqué el dilema es sólo aparente y no real.

Solución: La solución se obtiene solapando la secuencia de genes de cada cepa tal como se han transferido:

	2	*U*	*M*	*B*	*A*	*C*	*T*						
Cepa:	3					*C*	*T*	*E*	*R*	*I*	*U*		
	1							*E*	*R*	*I*	*U*	*M*	*B*

Comenzando por *B*, la secuencia de genes es *BACTERIUM*.

La cepa 4 origina un aparente dilema, que se resuelve constatando que el factor F se ha integrado en la orientación contraria; por ello los genes entran en la secuencia contraria, comenzando por el gen *R*:

$$\overrightarrow{MUIRETCAB}$$

4. En el análisis de la estructura fina del locus *rII* del fago T4, Benzer pudo realizar pruebas de complementación para cualquier par de mutaciones, una vez que tuvo claro que el locus tenía dos cistrones. Comprobó la complementación infectando simultáneamente *E. coli* K12 con dos cepas de fagos, cada una de ellas con una mutación distinta, ninguna de las cuales podía por si sola lisar a K12. De los siguientes datos, determine qué mutaciones están en cualquiera de los cistrones, asumiendo que la mutación 1 (M-1) está en el cistrón A y la mutación 2 (M-2) está en el cistrón B. ¿Hay algún caso en el que la mutación no pueda asignarse adecuadamente?

Par comprobado	Resultados*
1, 2	+
1, 3	−
1, 4	−
1, 5	+
2, 3	−
2, 4	+
2, 5	−

* + o − indica complementación o fallo de complementación, respectivamente.

Solución: M-1 y M-5 se complementan entre sí y por tanto no están en el mismo cistrón. Así, M-5 debe estar en el cistrón B. M-2 y M-4 complementan. Usando el mismo razonamiento, M-4 no está con M-2, y por consiguiente se encuentran en el cistrón A. M-3 no complementa ni con M-1 ni con M-2 y por ello parecería que está en ambos cistrones. Una explicación sería que la base física de M-3 de alguna manera solapa con ambos cistrones A y B. Podría ser una mutación doble, con una en cada cistrón. Podría ser también una deleción que solape con ambos cistrones, haciendo imposible la complementación con M-1 y M-2.

5. Se comprobó otra mutación, la M-6, con los resultados que se muestran a continuación.

Par comprobado	Resultados
1, 6	+
2, 6	−
3, 6	−
4, 6	+
5, 6	−

Deduzca todas las posibles conclusiones acerca de M-6.

Solución: Estos resultados están de acuerdo con la asignación de M-6 al cistrón B.

6. Luego se hizo una prueba de recombinación con M-2, M-5 y M-6 para cartografiar el cistrón B. El análisis de recombinación utilizando tanto *E. coli* B como K12 demostró que ocurría recombinación entre M-2 y M-5 y entre M-5 y M-6, pero no entre M-2 y M-6, ¿Por qué no?

Solución: M-2 y M-6 o son mutaciones idénticas o una de ellas puede ser una deleción que solape con la otra pero no con la M-5. Además, los datos no excluyen la posibilidad de que ambas sean deleciones.

7. En estudios de recombinación del locus *rII* del fago T4, ¿qué significado tiene el valor que se determina al calcular el crecimiento del fago en la cepa K12 respecto de la cepa B de *E. coli* después de la infección simultánea en *E. coli*? ¿Qué valor es siempre mayor?

Solución: Al realizar el análisis de calvas en *E. coli* B, en donde los dos fagos, de tipo silvestre y mutante, son líticos, se puede determinar el número total de fagos por mililitro. Debido a que casi todas las células son mutantes *rII* de uno u otro tipo, este valor es mucho mayor. Para evitar la lisis total de la placa, se necesita diluir mucho. Las mutaciones *rII* no crecerán en K12, pero los fagos de tipo silvestre si. Ya que los fagos de tipo silvestre son recombinantes raros, habrá relativamente un menor número y no se necesitará tanta dilución.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Diferencie los tres tipos de recombinación en bacterias.
2. Con respecto a los cruces bacterianos F^+ y F^-, responda a las siguientes preguntas:
   (a) ¿Cómo se estableció que el contacto físico era necesario?
   (b) ¿Cómo se estableció que la transferencia de cromosomas era unidireccional?
   (c) ¿Cuál es la base para que una bacteria sea F^+?
3. Haga una lista de todas las principales diferencias (a) entre los cruces bacterianos $F^+ \times F^-$ y Hfr $\times F^-$; y (b) entre las bacterias F^+, F^-, Hfr y F'.
4. Describa las bases de la cartografía cromosómica en el cruce Hfr $\times F^-$.
5. ¿Por qué los recombinantes que se producen en un cruce Hfr $\times F^-$ casi nunca son F^+?
6. Describa el origen de la bacteria F' y de los merozigotos.
7. Describa lo que se sabe acerca del mecanismo de la transformación.
8. En un experimento de transformación con una cepa bacteriana receptora de genotipo a^-b^-, se obtuvieron los siguientes resultados:

DNA transformante	Transformantes (%) a^+b^-	a^-b^+	a^+b^+
a^+b^+	3,1	1,2	0,04
a^+b^- y a^-b^+	2,4	1,4	0,03

¿Qué se puede concluir acerca de la localización de los genes *a* y *b* uno respecto del otro?

9. En un experimento de transformación, se obtuvo DNA donante de una cepa bacteriana protótrofa ($a^+b^+c^+$), siendo la receptora una cepa auxótrofa triple ($a^-b^-c^-$). Se recuperaron las siguientes clases transformantes:

$a^+b^-c^-$	180
$a^-b^+c^-$	150
$a^+b^+c^-$	210
$a^-b^-c^+$	179
$a^+b^-c^+$	2
$a^-b^+c^+$	1
$a^+b^+c^+$	3

¿Qué conclusiones se pueden deducir acerca de las relaciones de ligamiento entre estos tres genes?

10. Explique las observaciones que condujeron a Zinder y Lederberg a concluir que los protótrofos recuperados en sus experimentos de transducción no eran el resultado de una conjugación mediada por el factor F?
11. Defina los términos calva, lisogenia y profago.
12. Diferencie entre transducción generalizada y especializada
13. Se utilizaron dos cepas teóricas de virus ($a^-b^-c^-$ y $a^+b^+c^+$) para infectar simultáneamente un cultivo de una bacteria huésped. De las 10.000 calvas contadas, se observaron los siguientes genotipos:

$a^+b^+c^+$	4.100	$a^-b^+c^-$	160
$a^-b^-c^-$	3.990	$a^+b^-c^+$	140
$a^+b^-c^-$	740	$a^-b^-c^+$	90
$a^-b^+c^+$	670	$a^+b^+c^-$	110

Determine el mapa genético de estos tres genes en el cromosoma vírico. Decida si la interferencia es positiva o negativa.

14. Describa las condiciones para que pueda darse recombinación en bacteriófagos.
15. El genoma del bacteriófago consta principalmente de genes que codifican proteínas que forman la cabeza, el collar, la cola y las fibras de la cola. Cuando estos genes se transcriben después de la infección del fago, ¿cómo se sintetizan estas proteínas ya que el genoma del fago carece de los genes esenciales para la estructura del ribosoma?
16. Si un único bacteriófago infecta a una célula de *E. coli* que se encuentra en un césped bacteriano y, después de la lisis, se producen 200 virus viables, ¿cuántos fagos habrá en una calva si sólo se dan otros tres ciclos líticos?
17. Se sometió un cultivo bacteriano infectado por fagos a una serie de diluciones, y en cada caso se realizó un ensayo de calvas, con los resultados que se muestran a continuación. ¿Qué conclusiones se pueden deducir de cada una de las diluciones, suponiendo que se utilizó en cada ensayo de calvas 0,1ml?

	Factor de dilución	Resultados del ensayo
(a)	10^4	Todas las bacterias lisadas
(b)	10^5	14 plaques
(c)	10^6	0 plaques

18. En un estudio de complementación en el locus *rII* del fago T4, se comprobaron tres grupos de mutaciones diferentes. Para cada grupo sólo se comprobaron dos combinaciones. De acuerdo con cada una de estas series de datos, prediga los resultados del tercer experimento para cada grupo.

Grupo A	Grupo B	Grupo C
$d \times e$—lisis	$g \times b$—no lisis	$j \times k$—lisis
$d \times f$—no lisis	$g \times i$—no lisis	$j \times l$—lisis
$e \times f$—¿?	$b \times i$—¿?	$k \times l$—¿?

19. En un análisis de otros mutantes *rII*, las pruebas de complementación dieron los siguientes resultados:

Mutantes	Resultados (lisis + / −)
1, 2	+
1, 3	+
1, 4	−
1, 5	−

   (a) Prediga los resultados al comprobar juntos 2 y 3, 2 y 4, y 3 y 4.
   (b) Si pruebas posteriores dieran los siguientes resultados ¿qué concluiría acerca del mutante 5?

Mutantes	Resultados
2, 5	−
3, 5	−
4, 5	−

20. Utilizando los mutantes 2 y 3 del problema anterior, después de la infección mixta en *E. coli* B, los virus descendientes se sembraron, después de una serie de diluciones, tanto en *E. coli* B como en K12, con los siguientes resultados. ¿Cuál es la frecuencia de recombinación entre estos dos mutantes?

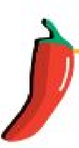
Cepa sembrada	Dilución	Calvas
E. coli B	10^{-5}	2
E. coli K12	10^{-1}	5

21. Se comprobó otra mutación, la 6, en relación con las mutaciones de la 1 a la 5 del problema anterior. En una primera prueba, el mutante 6 complementó con los mutantes 2 y 3. En una prueba de recombinación con 1, 4 y 5, el mutante 6 recombinó con 1 y 5, pero no con 4. ¿Qué puede concluir acerca de la mutación 6?

22. Cuando se utilizó la técnica de la conjugación interrumpida con cinco cepas diferentes de bacterias Hfr se observó el siguiente orden de entrada de los genes y de recombinación.

Cepa Hfr	Orden				
1	*T*	*C*	*H*	*R*	*O*
2	*H*	*R*	*O*	*M*	*B*
3	*M*	*O*	*R*	*H*	*C*
4	*M*	*B*	*A*	*K*	*T*
5	*C*	*T*	*K*	*A*	*B*

De acuerdo con estos datos, dibuje un mapa del cromosoma bacteriano. ¿Apoyan estos datos el concepto de circularidad?



Problemas extra-picantes

23. Al analizar siete mutaciones *rII* del fago T4, los mutantes 1, 2 y 6 se encontraban en el cistrón A, mientras que los mutantes 3, 4 y 5 se encontraban en el cistrón B. De estos, el mutante 4 era una deleción que solapaba con el mutante 5. Las restantes mutaciones eran puntuales. Nada se sabía acerca del mutante 7. Prediga los resultados de la complementación (+ o −) entre 1 y 2; 1 y 3; 2 y 4; y 4 y 5.

24. En estudios de recombinación entre 1 y 2 del problema anterior, se obtuvieron los siguientes resultados.

(a) Calcular la frecuencia de recombinación.

Cepa	Dilución	Calvas	Fenotipos
E. coli B	10^{-7}	4	*r*
E. coli K12	10^{-2}	8	+

(b) Cuando se comprobó la recombinación del mutante 6 con el mutante 1, los datos fueron los mismos que se muestran arriba para la cepa B, pero no para la cepa K12. El investigador perdió los datos de K12, pero recordaba que la recombinación fue 10 veces más frecuente que cuando comprobó los mutantes 1 y 2. ¿Cuáles era los datos perdidos (dilución y número de colonias)?

(c) El mutante 7 no complementaba con ninguna de las otras mutaciones (1-6). Defina la naturaleza del mutante 7.

25. En *Bacillus subtilis*, el análisis de ligamiento de dos genes que afectan a la síntesis de los aminoácidos triptófano (trp_2^-) y tirosina (tyr_1^-) se realizó utilizando transformación. Examine los datos posteriores y deduzca todas las posibles conclusiones en relación con el ligamiento. ¿Cuál es el papel de la parte B del experimento? [Referencia: E. Nester, M. Schafer y J. Lederberg (1963).]

DNA donante	Célula receptora	Transformantes	N.°
A. $trp_2^+\ tyr_1^+$	$trp_2^-\ tyr_1^-$	$trp^+\ tyr^-$	196
		$trp^-\ tyr^+$	328
		$trp^+\ tyr^+$	367
B. $trp_2^+\ tyr_1^-$ and $trp_2^-\ tyr_1^+$	$trp_2^-\ tyr_1^-$	$trp^+\ tyr^-$	190
		$trp^-\ tyr^+$	256
		$trp^+\ tyr^+$	2

26. Se utilizo una cepa Hfr para cartografiar tres genes mediante un experimento de conjugación interrumpida. El cruce fue $Hfr/a^+b^+c^+rif \times F^-/a^-b^-c^-rif^r$.(El orden de los alelos no implica su orden en el mapa; rif^r es resistencia al antibiótico rifampicina.) El gen a^+ se necesita para la síntesis del nutriente A, el b^+ para el nutriente B y el c^+ para el nutriente C. Los alelos menos son auxótrofos para estos nutrientes. El cruce se inició en el tiempo cero, y en tiempos distintos se sembraron mezclas del cruce en tres tipos de medios. Cada placa tenía el medio mínimo (MM) y rifampicina más el suplemento específico que se indica en la siguiente tabla. (Los resultados para cada tiempo se muestran como número de colonias que crecen en cada placa.)

Suplemento añadido al MM	Tiempo de la interrupción			
	5 min	10 min	15 min	20 min
Nutrientes A y B	0	0	4	21
Nutrientes B y C	0	5	23	40
Nutrientes A y C	4	25	60	82

(a) ¿Cuál es el papel de la rifampicina en el experimento?
(b) Basándose en estos datos, determine la localización aproximada en el cromosoma de los genes *a*, *b* y *c*, entre sí y en relación al factor F.
(c) ¿Se puede determinar la localización del gen *rif* en este experimento? Si no es así, diseñe un experimento para localizar el gen *rif* en relación con el factor F y con el gen *b*.

27. Se realiza un ensayo de calvas comenzando con un ml de una solución que contiene bacteriófagos. Esta solución se diluye serialmente tres veces, tomando 0,1 ml y añadiéndole 0,9 ml del medio líquido. 0,1 ml de la dilución final se siembra para un ensayo de calvas y produce 17 calvas. ¿Cuál es la densidad inicial de los bacteriófagos en el ml original?

28. En un experimento de cotransformación, utilizando varias combinaciones de genes, de dos en dos, se obtuvieron los siguientes datos.

Cotransformación con éxito	Cotransformación sin éxito
a y *d*; *b* y *c*; *b* y *f*	*a* y *b*; *a* y *c*; *a* y *f*; *d* y *b*; *d* y *c*; *d* y *f* *a* y *e*; *b* y *e*; *c* y *e* *d* y *e*; *f* y *e*

Determine qué genes están ligados y a quién.

29. Considerando los datos del Problema 28, se estudió otro gen, el *g*. Cuando se probó con *f* demostró cotransformación positiva. Prediga los resultados de los experimentos cuando se compruebe con los genes *a, b, c, d* y *e*.

30. La conjugación bacteriana, principalmente a través de plásmidos conjugativos como el F, representa una potencial amenaza sanitaria al compartir genes patógenos o de resistencia a antibióticos. Dado que en el intestino humano sano cohabitan más de 400 especies diferentes de bacterias y en la piel más de 200, Francisco Dionisio [*Genetics* (2002) 162:1525-1532] investigó la capacidad de los plásmidos para la transferencia por conjugación entre especies. Los datos que se presentan abajo implican a varias especies de la enterobacteria del género *Escherichia*. Los datos se presentan en valores de «logaritmo en base 10» en donde, por ejemplo, −2,0 sería equivalente a 10^{-2} como tasa de transferencia. Asuma que todas las diferencias entre los valores presentados son significativas estadísticamente.

	Donante			
Receptor	*E. chrysanthemi*	*E. blattae*	*E. fergusonii*	*E. coli*
E. chrysanthemi	−2,4	−4,7	−5,8	−3,7
E. blattae	−2,0	−3,4	−5,2	−3,4
E. fergusonii	−3,4	−5,0	−5,8	−4,2
E. coli	−1,7	−3,7	−5,3	−3,5

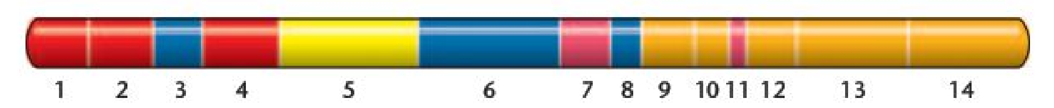
(a) ¿Qué conclusión o conclusiones se pueden deducir de estos datos?
(b) ¿En que especie es más probable la transferencia intraespecífica? ¿Entre qué pareja de especies es más probable la transferencia interespecífica?
(c) ¿Cuál es el significado de estos hallazgos en relación con la salud humana?

31. Se llevó a cabo un estudio para intentar determinar qué regiones funcionales de un gen de transferencia conjugativa (*tra1*) están implicadas en la transferencia del plásmido R27 de *Salmonella enterica*. El plásmido R27 tiene un significativo interés clínico ya que puede codificar resistencia múltiple a antibióticos para la fiebre tifoidea. Para identificar las regiones funcionales responsables de la transferencia conjugativa, Lawley et al. (2002. *J. Bacteriol.* 184:2173-2180) llevó a cabo un análisis en donde regiones concretas del gen *tra1* se mutaron y comprobaron en cuanto a su impacto en la conjugación. más abajo se muestra un mapa de las regiones comprobadas, que se creía estaban implicadas en la transferencia conjugativa del R27. Color similar indica función relacionada. Los números se refieren a cada región funcional sujeta al análisis mutacional. Después del mapa hay una tabla que muestra los efectos de estas mutaciones sobre la conjugación de R27.

Efecto de las mutaciones en las regiones funcionales de la región de transferencia 1(*tra1*) sobre la conjugación de R27

Mutación en la región R27	Transferencia conjugativa	Frecuencia relativa de conjugación (%)
1	+	100
2	+	100
3	−	0
4	+	100
5	−	0
6	−	0
7	+	12
8	−	0
9	−	0
10	−	0
11	+	13
12	−	0
13	−	0
14	−	0

(a) Dados los datos anteriores, ¿parecen influir todas las regiones funcionales en la transferencia conjugativa de manera similar?
(b) ¿Qué regiones parecen tener más impacto en la conjugación?
(c) ¿Qué regiones parecen tener un impacto limitado en la conjugación?
(d) ¿Qué conclusiones se podrían deducir de estos datos?



Lecturas seleccionadas

Benzer, S. 1962. The fine structure of the gene. *Sci. Am.* (Jan.) 206: 70-86.

Brock, T. 1990. *The emergence of bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cairns, J., Stent, G.S., and Watson, J.D., eds. 1966. *Phage and the origins of molecular biology*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Campbell, A.M. 1976. How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell. *Sci. Am.* (Dec.) 235:102-13.

Hayes, W. 1953. The mechanisms of genetic recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 18:75–93.

Hershey, A.D. 1946. Spontaneous mutations in a bacterial virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11:67-76.

Hershey, A.D., and Rotman, R. 1949. Genetic recombination between host range and plaque-type mutants of bacteriophage in single cells. *Genetics* 34:44-71.

Hotchkiss, R.D., and Marmur, J. 1954. Double marker transformations as evidence of linked factors in deoxyribonucleate transforming agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40:55-60.

Jacob, F., and Wollman, E.L. 1961. Viruses and genes. *Sci. Am.* (June) 204:92–106.

Lederberg, J. 1986. Forty years of genetic recombination in bacteria: A fortieth anniversary reminiscence. *Nature* 324:627-28.

Luria, S.E., and Delbruck, M. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28:491-511.

Lwoff, A. 1953. Lysogeny. *Bacteriol. Rev.* 17:269-336.

Miller, J.H. 1992. *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

Morse, M.L., Lederberg, E.M., and Lederberg, J. 1956. Transduction in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 41:141-56.

Nester, E., Schafer, M., and Lederberg, J. 1963. Gene linkage in DNA transfer: A cluster of genes in *Bacillus subtilis*. *Genetics* 48:529-51.

Novick, R.P. 1980. Plasmids. *Sci. Am.* (Dec.) 243:102-26.

Smith-Keary, P.F. 1989. *Molecular genetics of Escherichia coli*. New York: Guilford Press.

Stahl, F.W. 1987. Genetic recombination. *Sci. Am.* (Nov.) 256:91-101.

Stent, G.S. 1963. *Molecular biology of bacterial viruses*. New York: W.H. Freeman.

Tessman, I. 1965. Genetic ultrafine structure in the T4 *rII* region. *Genetics* 51:63-75.

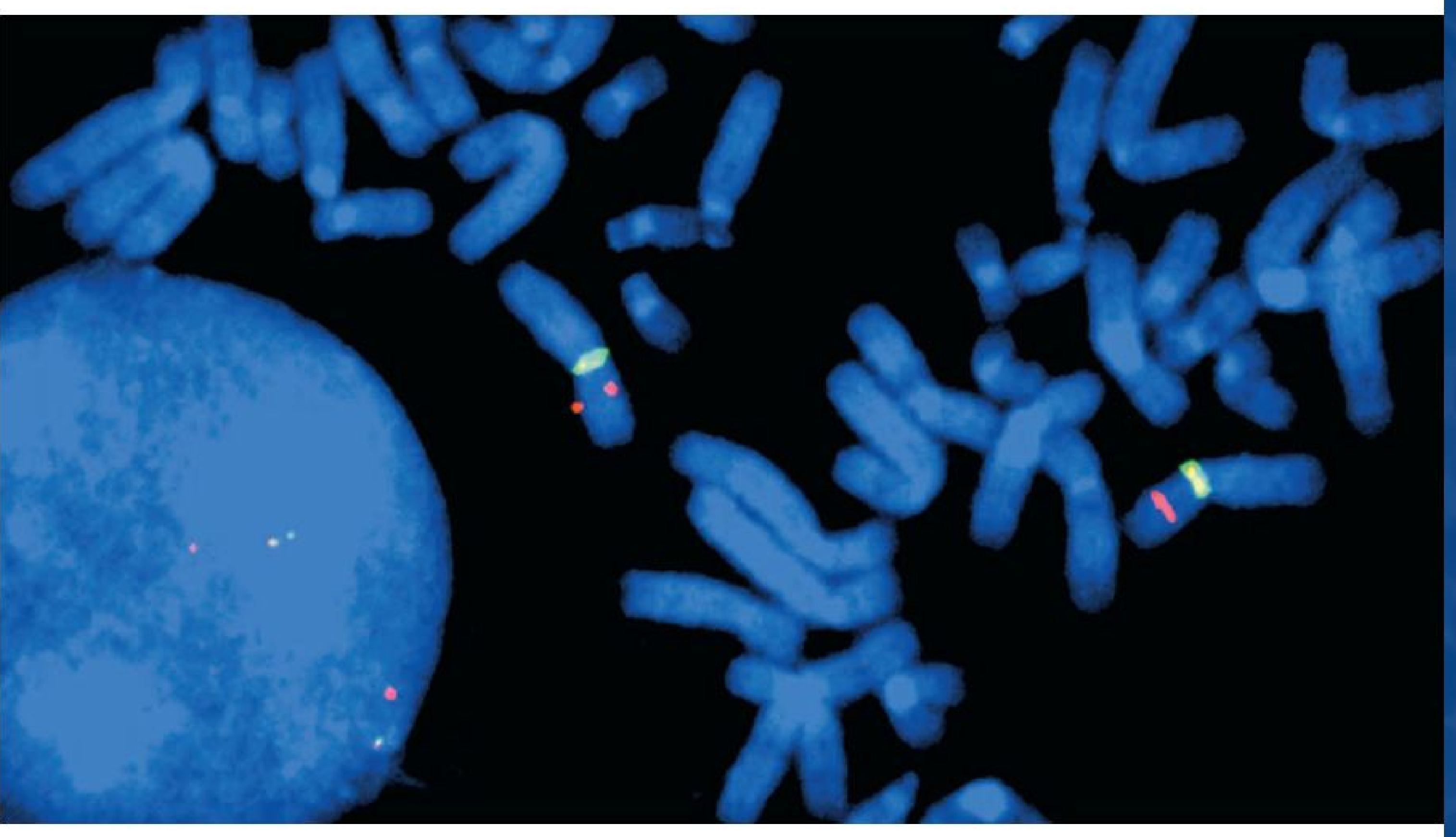
Wollman, E.L., Jacob, F., and Hayes, W. 1956. Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21:141-62.

Zinder, N.D. 1958. Transduction in bacteria. *Sci. Am.* (Nov.) 199:38–46.

______. 1992. Forty years ago: The discovery of bacterial transduction. *Genetics* 132:291-94.

Zinder, N.D., and Lederberg, J. 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 64:679-99.

Determinación del sexo y cromosomas sexuales



Cromosomas X humanos marcados utilizando hibridación in situ con fluorescencia (FISH), en donde sondas específicas se unen a secuencias de DNA específicas. La fluorescencia verde es específica del DNA centromérico de los cromosomas X. La fluorescencia roja es específica de secuencias de DNA del gen de la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La reproducción sexual, que incrementa enormemente la variación genética en las especies, requiere mecanismos que den lugar a diferenciación sexual.
- En los organismos ha evolucionado una amplia variedad de mecanismos genéticos que han dado lugar al dimorfismo sexual.
- Muy a menudo, genes concretos, normalmente en un único cromosoma, dan lugar a la masculinidad o feminidad en el desarrollo.
- En la especie humana, se puede tolerar la presencia de un cromosoma extra X o Y mas allá del número diploide, pero a menudo da lugar a síndromes que presentan fenotipos característicos.
- Mientras que la segregación de los cromosomas que determinan el sexo daría lugar teóricamente a una proporción de sexos de machos y hembras uno a uno, en la especie humana esta proporción esta desviada en la concepción a favor de los varones.
- En los mamíferos, las hembras tienen dos cromosomas X frente a uno en los machos, pero la información genética extra en las hembras viene compensada por la inactivación al azar de uno de los cromosomas X en los inicios del desarrollo.
- En algunas especies de reptiles, la temperatura durante la incubación de los huevos determina el sexo de la descendencia.

En el mundo biológico se reconoce una amplia variedad de tipos de reproducción y ciclos biológicos. Hay organismos que no manifiestan evidencias de reproducción sexual. Otros alternan cortos periodos de reproducción sexual con prolongados periodos de reproducción asexual. Sin embargo, en muchos eucariotas diploides la reproducción sexual es el único mecanismo natural que da lugar a nuevos miembros de la especie. La transmisión ordenada de las unidades genéticas de padres a hijos y, así mismo, de cualquier variabilidad fenotípica, descansa en los procesos de segregación y transmisión independientes que ocurren en la meiosis. La meiosis da lugar a gametos haploides por lo que, después de la fecundación, la descendencia resultante mantiene el número diploide de cromosomas característico de su especie. Por ello, la meiosis asegura la constancia genética entre los miembros de la misma especie.

Estos hechos, que están relacionados con la perpetuación de todos los organismos con reproducción sexual, dependen en último término de una unión eficaz de los gametos en la fecundación. A su vez, un emparejamiento exitoso entre los organismos, que es la base para la fecundación, depende de alguna forma de diferenciación sexual en los organismos. Aun cuando no es manifiestamente evidente, esta diferenciación se produce en los organismos incluso en las menos evolucionadas bacterias y algas eucariotas unicelulares. En las formas de vida evolutivamente superiores, la diferenciación de los sexos en cada especie es más evidente como dimorfismo fenotípico en machos y hembras. El escudo y la lanza ♂, el antiguo símbolo del hierro y de Marte, y el espejo ♀, el símbolo del cobre y de Venus, representan la masculinidad y la feminidad adquiridas por los individuos.

Los **cromosomas heteromórficos**, o distintos, como el par X-Y, caracterizan a menudo a un sexo o al otro, dando lugar a su denominación de **cromosomas sexuales**. No obstante, son los genes, mas que los cromosomas, los que finalmente sirven de base subyacente para la **determinación del sexo**. Como veremos, algunos de estos genes se encuentran en los cromosomas sexuales, pero otros son autosómicos. Amplias investigaciones han revelado una gran variedad de sistemas de cromosomas sexuales, incluso en organismos muy emparentados, lo que sugiere que los mecanismos que controlan la determinación del sexo han sufrido en muchos casos una evolución rápida.

En este capítulo revisaremos primero varios tipos representativos de diferenciación sexual examinando los ciclos biológicos de tres **organismos modelo** estudiados a menudo en genética: el alga verde *Chlamydomonas*; la planta del maíz, *Zea mays*; y el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (a menudo referido como *C. elegans*). Estos servirán para contrastar los diferentes papeles que juega la diferenciación sexual en la vida de diversos organismos. Luego, ahondaremos mas en lo que se sabe sobre las bases genéticas de la determinación de las diferencias sexuales, con un particular énfasis en otros dos organismos: nuestra propia especie, en representación de los mamíferos y *Drosophila*, objeto de los primeros estudios sobre la determinación del sexo.

7.1 Diferenciación sexual y ciclos biológicos

En los organismos pluricelulares es importante distinguir entre **diferenciación sexual primaria**, que implica sólo a las gónadas en donde se producen los gametos, y **diferenciación sexual secundaria**, que implica a la apariencia global del organismo, incluidas las diferencias patentes en órganos tales como las glándulas mamarias y los genitales externos. En vegetales y animales, los términos **unisexual**, **dióico** y **gonocórico** son equivalentes; todos ellos se refieren a individuos que tienen sólo órganos reproductores masculinos *o* femeninos. Por el contrario, los términos **bisexual**, **monoico** y **hermafrodita** se refieren a individuos que tienen órganos reproductivos tanto masculinos *como* femeninos, algo que ocurre frecuentemente en los reinos animal y vegetal. Estos organismos pueden dar lugar a gametos fértiles de los dos sexos. El término **intersexo** normalmente se reserva para individuos con una diferenciación sexual intermedia, que son muy frecuentemente estériles.

Chlamydomonas

El ciclo biológico del alga verde *Chlamydomonas*, que se muestra en la Figura 7.1, es representativo de los organismos que presentan sólo raramente periodos de reproducción sexual. Tales organismos pasan la mayor parte de su ciclo biológico en fase haploide, produciendo asexualmente células hijas por división mitótica. Sin embargo, en condiciones nutritivas desfavorables, como agotamiento del nitrógeno, ciertas células hijas funcionan como gametos. Después de la fecundación se forma un zigoto diploide, que puede resistir el ambiente desfavorable. Cuando las condiciones son más adecuadas, se sigue la meiosis y se producen de nuevo células vegetativas haploides. En tales especies hay pocas diferencias visibles entre las células vegetativas haploides que se reproducen asexualmente y los gametos haploides implicados en la reproducción sexual. Los dos gametos que se fusionan, normalmente no se distinguen morfológicamente. Tales gametos se denominan **isogametos** y las especies que los producen se dice que son **isógamas**.

En 1954, Ruth Sager y Sam Granik demostraron que los gametos de *Chlamydomonas* podían subdividirse en dos **tipos apareantes**. Trabajando con clones derivados de una célula haploide, demostraron que las células de un clon dado se cruzaban con células de algún otro, pero no de todos los otros clones. Cuando comprobaron la capacidad de apareamiento de un gran número de clones, todos se pudieron situar en una de las dos categorías de apareamiento, células bien mt^{+} o mt^{-}. Las células «más» solo se cruzan con las células «menos» y viceversa, como se representan en la Figura 7.2. Después de la fecundación y la meiosis, se encontró que de las cuatro células haploides producidas (**zoosporas**) dos eran del tipo más y dos del tipo menos.

Experimentos posteriores establecieron diferencias químicas entre las células mas y menos. Cuando se prepararon ex-

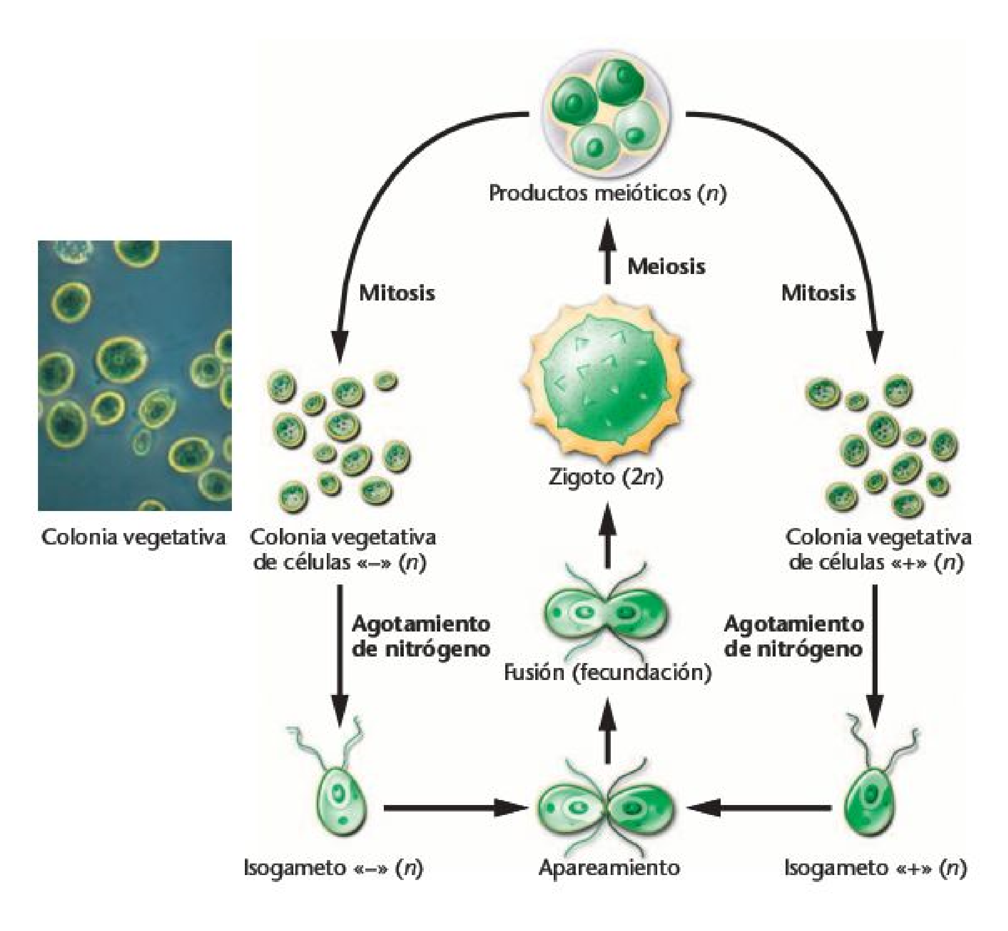


FIGURA 7.1 Ciclo biológico de *Chlamydomonas*. Las condiciones desfavorables estimulan la formación de isogametos de tipos de apareamiento opuestos, que se pueden fusionar en la fecundación. El zigoto resultante sufre meiosis, dando lugar a dos células haploides de cada tipo de apareamiento. La fotografía muestra células vegetativas de esta alga verde.

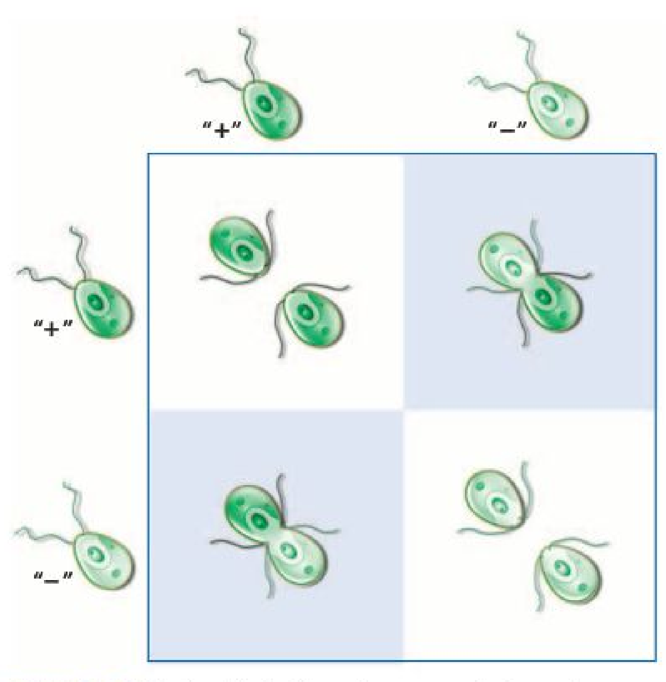


FIGURA 7.2 Ilustración de tipos de apareamiento en la fecundación de *Chlamydomonas*. Los apareamientos ocurren sólo cuando se encuentran una célula mas (+) y una célula menos (−).

tractos de células clonadas de *Chlamydomonas* (o de sus flagelos) y se añadieran a células del tipo de apareamiento opuesto se producía aglutinación. Tal aglutinación no se producía si el extracto añadido a las células procedía de células del mismo tipo de apareamiento. Estas observaciones sugerían que, a pesar de las semejanzas morfológicas entre los isogametos, entre ellos se había producido una diferenciación química. Por consiguiente, en esta alga existe un tipo primitivo de diferenciación sexual, aun cuando no hay indicación morfológica de que haya ocurrido tal diferenciación.

Zea mays

Como discutimos en el Capítulo 2 (véase la Figura 2.16), en el ciclo biológico de muchos vegetales hay alternancia entre la fase gametofítica haploide y la fase esporofítica diploide. La meiosis y la fecundación conectan las dos fases del ciclo biológico. La duración relativa de las dos fases varía en los principales grupos vegetales. En algunos vegetales sin semillas, como los musgos, la fase gametofítica haploide y las estructuras morfológicas que representan esta fase son predominantes. Lo contrario ocurre en los vegetales con semillas.

El maíz (*Zea mays*) es un ejemplo de planta monoica con semillas, en donde la fase esporofítica y las estructuras morfológicas que la representan son predominantes en el ciclo biológico. En la planta adulta se encuentran tanto las estructuras masculinas como las femeninas. Por ello, la determinación del

sexo debe darse de manera distinta en tejidos distintos del mismo organismo, como se ilustra en el ciclo biológico de esta familiar planta (Figura 7.3). Los **estambres**, o **inflorescencias masculinas**, producen células madres de microsporas diploides, cada una de las cuales sufre meiosis y da lugar a cuatro microsporas haploides. A su vez, cada microspora haploide se desarrolla en un microgametófito masculino maduro —el grano de polen— que tiene dos núcleos espermáticos con genotipos idénticos.



En el **pistilo** del esporófito se encuentran células diploides femeninas comparables, conocidas como células madres de las macrosporas. Después de la meiosis sólo sobrevive una de las cuatro macrosporas haploides. Normalmente se divide mitóticamente tres veces, produciendo un total de ocho núcleos haploides, genéticamente idénticos, dentro del saco embrionario. Dos de estos núcleos próximos al centro del saco embrionario se convierten en los núcleos del endospermo. Al final del micrópilo, el saco en donde penetra el esperma, quedan tres núcleos, el núcleo del oocito y dos sinérgidas. Los otros tres núcleos de las antípodas se agrupan en el extremo opuesto del saco embrionario.

La polinización se produce cuando los granos de polen hacen contacto con el estigma del pistilo y desarrollan largos tubos polínicos que crecen hacia el saco embrionario. Cuando hacen contacto en el micrópilo, los núcleos espermáticos entran en el saco embrionario. Uno de los núcleos espermáticos se une con el núcleo del oocito y el otro se une con los dos núcleos del endospermo. Este proceso, conocido como *doble fecundación*, da lugar al núcleo diploide del zigoto y al núcleo triploide del endospermo, respectivamente. Cada mazorca de maíz puede tener hasta 1.000 de estas estructuras, cada una de las cuales da lugar a un grano de maíz. Si se permite su germinación, cada grano de maíz da lugar a una nueva planta, el *esporófito*.

El mecanismo de la determinación y de la diferenciación del sexo en una planta monoica como *Zea mays*, en donde los tejidos que forman tanto gametos masculinos como femeninos tienen la misma constitución genética, fue difícil de comprender al principio. Sin embargo, el descubrimiento de un gran número de genes mutantes que interrumpen la formación normal

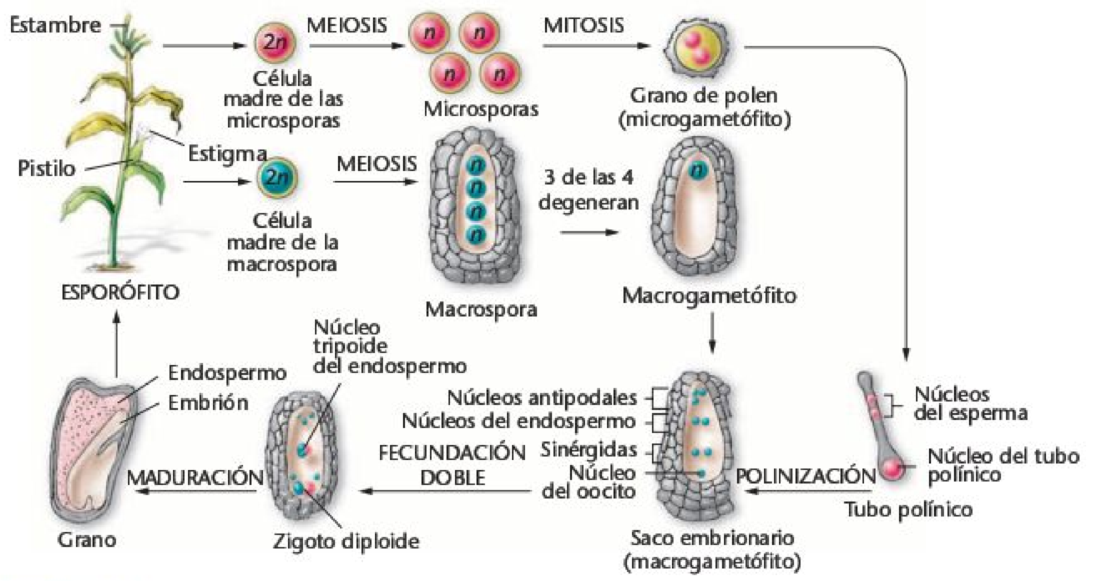


FIGURA 7.3 Ciclo biológico del maíz (*Zea mays*). El esporófito diploide lleva estambres y pistilos que dan lugar a microsporas y macrosporas haploides, que dan lugar al grano de polen y al saco embrionario que finalmente albergan al esperma y al oocito, respectivamente. Después de la fecundación, el embrión se desarrolla dentro del grano y se nutre por el endospermo. La germinación del grano da lugar a un nuevo esporófito (la planta de maíz madura) y se repite el mismo ciclo.

de la inflorescencia masculina y del pistilo apoya la idea de que los productos normales de estos genes juegan un papel importante en la determinación del sexo, afectando a la diferenciación de tejidos masculinos o femeninos de varios modos.

Por ejemplo, genes mutantes que dan lugar a la inversión del sexo proporcionan información importante. En homozigosis, todas las mutaciones clasificadas como *tassel seed* (*ts*) interfieren en la producción de la inflorescencia masculina e inducen la formación de estructuras femeninas. Así, es posible para un solo gen dar lugar a que plantas normalmente monoicas se conviertan funcionalmente en hembras. Por otro lado, las mutaciones recesivas *silkless* (*sk*) y *barren stalk* (*ba*) interfieren en el desarrollo del pistilo, dando lugar a plantas con órganos reproductivos exclusivamente masculinos.

Datos reunidos de estudios de estos y otros mutantes sugieren que los productos de muchos alelos silvestres de estos genes interactúan en el control de la determinación del sexo. Durante el desarrollo ciertas células quedan «determinadas» para convertirse en estructuras masculinas o femeninas. Después de la diferenciación sexual en estructuras masculinas o femeninas, se producen gametos masculinos o femeninos.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos qué genes específicos del maíz juegan un papel en la diferenciación sexual?

Caenorhabditis elegans

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* [abreviado *C. elegans*; Figura 7.4(a)] se ha convertido en un organismo popular en estudios genéticos, especialmente en las investigaciones sobre el control genético del desarrollo. Su utilidad se basa en el hecho de que el adulto hermafrodita consta exactamente de 959 células y se puede seguir el destino de cada célula desde su origen embrionario específico. Entre los muchos fenotipos mutantes interesantes que se han estudiado, los que modifican el comportamiento han sido un tema de investigación favorito.

En estos gusanos hay dos fenotipos sexuales; los machos, que sólo tienen testículos, y los hermafroditas que tienen tanto testículos como ovarios. Durante el desarrollo larvario de los hermafroditas, se forman testículos que producen esperma, que es almacenado. También se producen ovarios, pero la oogénesis no ocurre hasta que se alcanza el estadio adulto varios días después. Los huevos desarrollados se fecundan por el esperma almacenado en un proceso de autofecundación.

El resultado de este proceso es muy interesante [Figura 7.4(b)]. La gran mayoría de los organismos son hermafroditas, como el gusano paterno; menos del 1 por ciento de los descendientes son machos. Los machos adultos pueden cruzarse con hermafroditas, dando lugar a una descendencia aproximadamente mitad machos mitad hermafroditas.

(a)



(b)

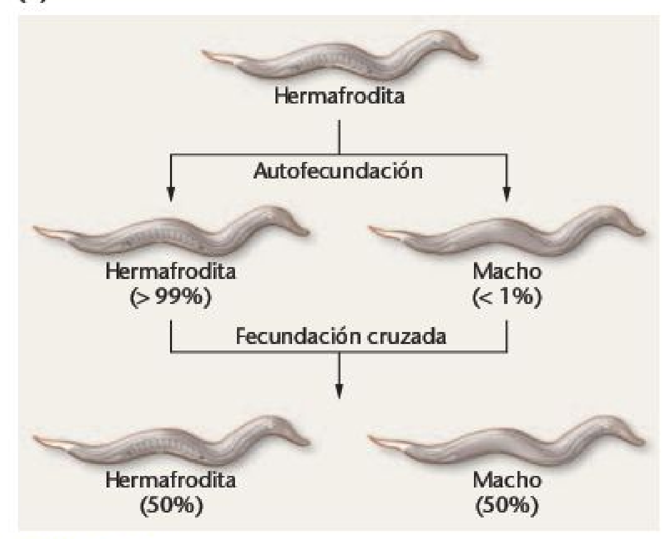


FIGURA 7.4 (a) Fotomicrografía de un nemátodo hermafrodita, *C elegans*; (b) Resultados de la autofecundación de un hermafrodita y del cruce de un hermafrodita con un macho.

La señal genética que determina la masculinidad frente al hermafroditismo la proporcionan genes localizados tanto en el cromosoma X como en los autosomas. *C. elegans* carece de cromosoma Y. Los hermafroditas tienen dos cromosomas X mientras que los machos tienen un solo cromosoma X. Se cree que la proporción de cromosomas X respecto del número de dotaciones de autosomas determina el sexo de estos nemátodos. Una proporción igual a 1 (dos cromosomas X y dos copias de cada autosoma) da lugar a hermafroditas y una proporción igual a 0,5 da lugar a machos. La ausencia de un cromosoma Y heteromórfico no es rara en los organismos.

Ahora resuelva esto

En el Problema 7.22 de la página 209 se le pide que diseñe un experimento para aclarar los originales hallazgos relativos a la determinación del sexo en un gusano marino.

Sugerencia: Un planteamiento obvio sería intentar aislar y diseñar experimentos con el factor desconocido que afecta a la determinación del sexo. Un planteamiento alternativo, mas de acuerdo con el análisis genético, podría ser el estudio de mutaciones que alteren los resultados normales.

7.2 Los cromosomas X e Y fueron relacionados por primera vez con la determinación del sexo a principios del siglo XX

Cómo se determina el sexo ha intrigado hace mucho a los genéticos. En 1891, H. Henking identificó una estructura en el núcleo del esperma de ciertos insectos, que denominó el *cuerpo X*. Varios años después, Clarance McClung demostró que en el esperma de algunos saltamontes había una estructura genética rara, que denominó *heterocromosoma*, pero el resto carecía de dicha estructura. Asoció erróneamente su presencia con la producción de descendencia masculina. En 1906, Edmund B. Wilson clarificó los descubrimientos de Henking y McClung al demostrar que células somáticas de hembras del insecto *Protenor* tenían 14 cromosomas, incluidos dos cromosomas X. En la oogénesis se produce una reducción, dando lugar a gametos con 7 cromosomas, incluido un cromosoma X. Por otro lado, las células somáticas masculinas, tenían sólo 13 cromosomas, incluido un único cromosoma X. En las espermatogénesis se producen gametos con 6 cromosomas, sin cromosoma X, o con 7 cromosomas, uno de los cuales es un cromosoma X. La fecundación por un esperma que lleva X da lugar a descendencia femenina y la fecundación por un esperma sin X da lugar a descendencia masculina [Figura 7.5(a)].

La presencia o ausencia del cromosoma X en los gametos masculinos es un mecanismo eficiente para la determinación del sexo en esta especie y da lugar a una proporción sexual 1:1 en la descendencia resultante. El mecanismo, denominado en la actualidad **XX/X0** o **tipo de determinación sexual *Protenor***, depende de la distribución al azar del cromosoma X en la mitad de los gametos masculinos en la segregación.

Wilson también experimentó con el hemíptero *Lygaeus turicus*, en donde los dos sexos tienen 14 cromosomas. Doce de estos son autosomas. Además, las hembras tienen dos cromosomas X mientras que los machos tienen un único cromosoma X y un pequeño heterocromosoma denominado **cromosoma Y**. Las hembras de esta especie producen solo gametos con la constitución (6A + X), pero los machos producen dos tipos de gametos en la misma proporción: (6A + X) y (6A + Y). Por consiguiente, después de la fecundación al azar, se producirá igual número de descendencia masculina que femenina con distintos complementos cromosómicos. Este tipo de determinación del sexo se denomina ***Lygaeus*** o **XX/XY** [Figura 7.5(b)].

En los insectos *Protenor* y *Lygaeus*, los machos producen gametos diferentes. Por ello reciben el nombre de **sexo heterogamético** y en efecto, sus gametos determinan finalmente el sexo de la descendencia en dichas especies. En tales casos, las hembras, que tienen cromosomas sexuales iguales, constituyen el **sexo homogamético**, produciendo el mismo tipo de gametos en relación con el número y tipo de cromosomas.

El macho no es siempre el sexo heterogamético. En otros organismos, la hembra produce gametos diferentes, presen-

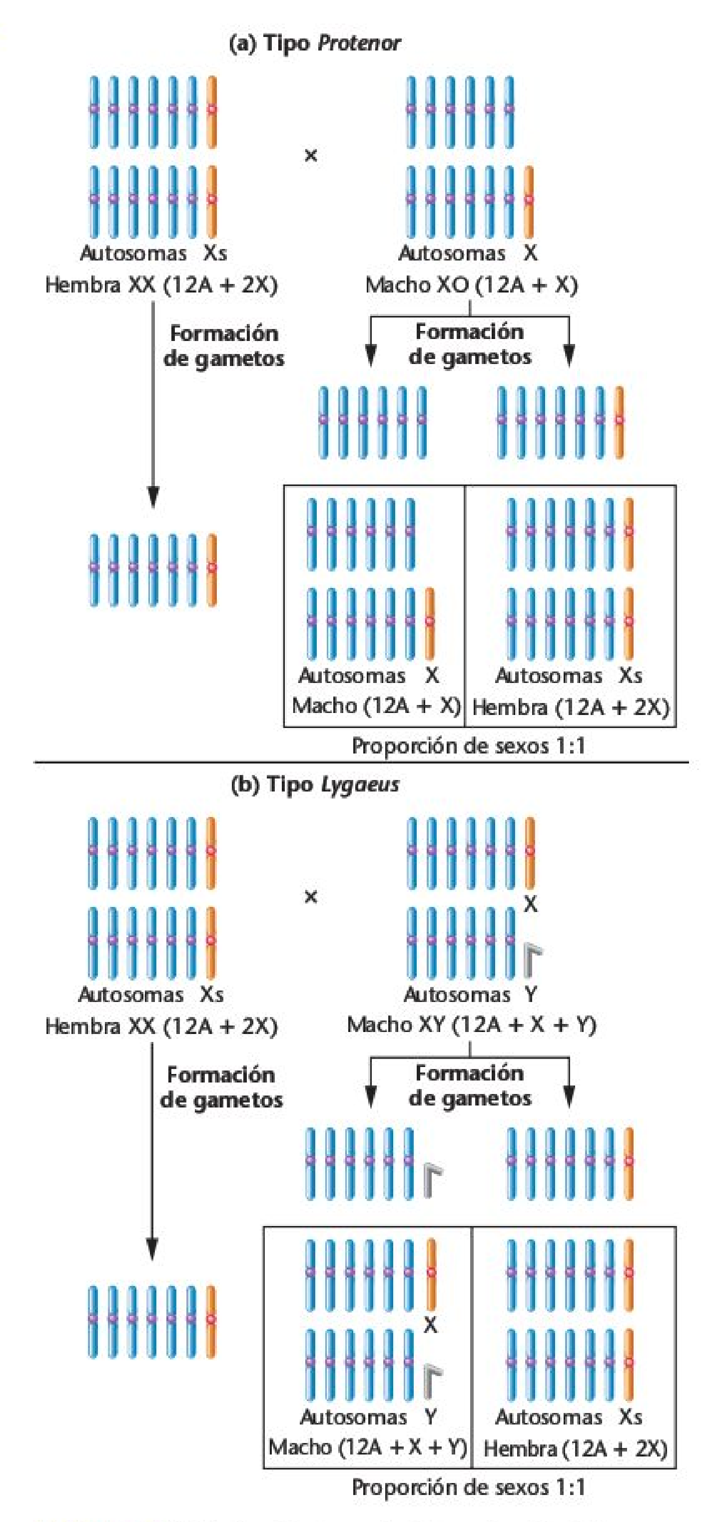


FIGURA 7.5 (a) El tipo *Protenor* de determinación del sexo, en donde el sexo heterogamético (el macho en este ejemplo) es X0 y produce gametos con y sin cromosoma X; (b) El tipo *Lygaeus* de determinación del sexo, en donde el sexo heterogamético (de nuevo, el macho en este ejemplo) es XY y produce gametos con el cromosoma X o con el Y. En ambos casos, la composición cromosómica de los descendientes determina su sexo.

tando un tipo de determinación del sexo *Protenor* (XX/X0) o *Lygaeus* (XX/XY). Entre los ejemplos se incluyen las polillas, las mariposas, muchas aves, algunos peces, reptiles, anfibios y al menos una especie de planta (*Fragaria orientalis*). Para distinguir de manera inmediata situaciones en las que la hembra es el sexo heterogamético, algunos autores utilizan la notación **ZZ/ZW**, en donde ZW es la hembra heterogamética, en lugar de la notación XX/XY.

La situación con las gallinas ilustra la dificultad de establecer cuál es el sexo heterogamético y si es adecuado el tipo *Protenor* o el *Lygaeus*. Mientras que las pruebas genéticas apoyan la hipótesis de que la hembra es el sexo heterogamético, la identificación citológica del cromosoma sexual no se realizó hasta 1961, debido al enorme número de cromosomas (78) característico de las gallinas. Cuando finalmente se identificaron los cromosomas sexuales, se demostró que la hembra tenía un par de cromosomas diferentes, incluido un cromosoma heteromórfico (el cromosoma W). Así, en las gallinas la hembra es realmente heterogamética y se caracteriza por el tipo de determinación sexual *Lygaeus*.

7.3 El cromosoma Y determina la masculinidad en los humanos

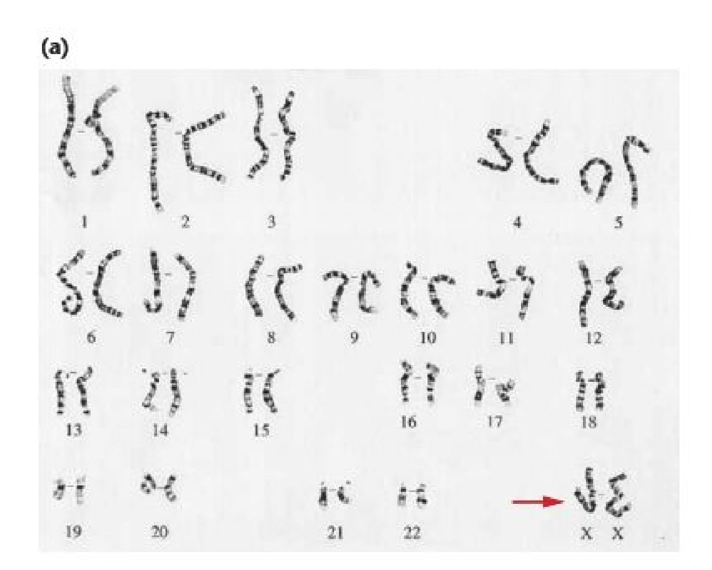
El primer intento de comprender la determinación del sexo en nuestra propia especie ocurrió hace casi 100 años e implicó el examen de los cromosomas presentes en células en división. Se hicieron esfuerzos para determinar con exactitud el número diploide de cromosomas humanos, pero debido al número relativamente grande de cromosomas, esto fue muy difícil. En 1912, H. von Winiwarter contó 47 cromosomas en preparaciones de espermatogonias en metafase. Se creyó que el mecanismo de la determinación del sexo en humanos se basaba en la presencia de un cromosoma extra en las mujeres, que tendrían 48 cromosomas. Sin embargo en la década de 1920, Theophilus Painter observó entre 45 y 48 cromosomas en células de tejido testicular y también descubrió al pequeño cromosoma Y, que se sabe ahora se encuentra sólo en varones. En su trabajo original, Painter sugirió 46 como el número diploide en humanos, pero posteriormente concluyó de manera incorrecta que el número de cromosomas era 48 tanto en varones como en mujeres.

Durante 30 años se aceptó este número. Luego, en 1956, Joe Hin Tjio y Albert Levan descubrieron un modo mejor para preparar cromosomas. Esta mejora técnica condujo a una clarísima preparación de metafases que demostró que el número diploide en humanos era realmente de 46. Mas tarde, el mismo año, C.E. Ford y John L. Hamerton, trabajando también con tejido testicular, confirmaron este hallazgo. El cariotipo familiar humano (Figura 7.6) se basa en la técnica de Tjio y Levan.

Entre las 23 parejas normales de cromosomas humanos, una presentó una configuración distinta en varones y mujeres. Estos dos cromosomas se designaron como los cromosomas sexuales X e Y. La mujer tiene dos cromosomas X y el varón un cromosoma X y un cromosoma Y.

Podríamos creer que esta observación es suficiente para concluir que el cromosoma Y determina la masculinidad. Sin embargo, son posibles otras interpretaciones. El Y podría no jugar un papel en la determinación del sexo; la presencia de dos cromosomas X podría dar lugar a la feminidad; o la masculinidad podría ser el resultado de la ausencia del segundo cromosoma X. Las pruebas que clarificaron cuál de las explicaciones era la correcta tuvieron que esperar al estudio de la variación de la composición de los cromosomas sexuales humanos. Como tales investigaciones revelaron, el cromosoma Y determina realmente la masculinidad en los humanos.

(a)



(b)

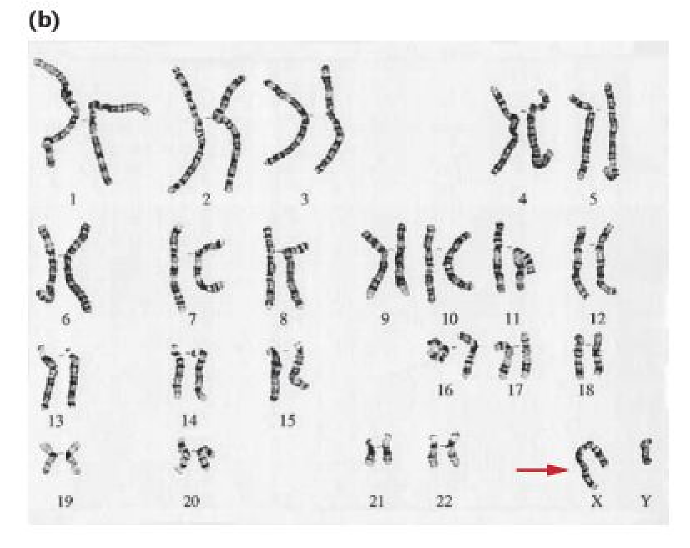


FIGURA 7.6 El tradicional cariotipo de la especie humana proveniente de una mujer y un varón normales. Cada uno tiene 22 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. La mujer (a) tiene dos cromosomas X mientras que el varón (b) tiene un cromosoma X y un cromosoma Y (véanse las flechas).

Los síndromes de Klinefelter y Turner

Hacia 1940, los científicos identificaron dos anomalías humanas caracterizadas por un desarrollo sexual anormal, el **síndrome de Klinefelter** y el **síndrome de Turner**. Los individuos con el síndrome de Klinefelter tienen genitales y conductos internos normalmente masculinos, pero sus testículos son rudimentarios y no producen esperma. En general son altos, con largos brazos y piernas y grandes manos y pies.

Aunque se produce algún desarrollo masculino, el desarrollo sexual femenino no está totalmente suprimido. Es frecuente un ligero aumento de las glándulas mamarias (ginecomastia) y a menudo las caderas son redondeadas. Este desarrollo sexual ambiguo, denominado intersexualidad, puede dar lugar a un desarrollo social anormal. A menudo la inteligencia está por debajo del rango normal.

En el síndrome de Turner, los individuos afectados tienen genitales externos y conductos internos femeninos, pero los ovarios son rudimentarios. Otras anormalidades características incluyen estatura baja (normalmente por debajo del metro y medio), pliegues cutáneos en la parte posterior del cuello, y mamas poco desarrolladas. A veces se advierte un tórax ancho, en escudo. La inteligencia es a menudo normal.

En 1959 se determinaron los cariotipos de individuos con estos síndromes, que resultaron anormales respecto de los cromosomas sexuales. Los individuos con el síndrome de Klinefelter tienen más de un cromosoma X. Lo mas frecuente es que tengan un complemento XXY, además de los 44 autosomas [Figura 7.7(a)]. Las personas con este cariotipo se designan **47,XXY**. Los individuos con el síndrome de Turner son muy a menudo monosómicos y tienen sólo 45 cromosomas, incluido un único cromosoma X. Se designan **45,X** [Figura 7.7(b)]. Advierta la convención utilizada para designar las composiciones cromosómicas anteriores. El número indica el número total de cromosomas presentes, y la información después de la coma designa la desviación respecto del contenido diploide normal. Ambas situaciones son el resultado de una no disyunción, el fallo de la segregación adecuada de los cromosomas X en la meiosis. (Véase la Figura 2.17.)

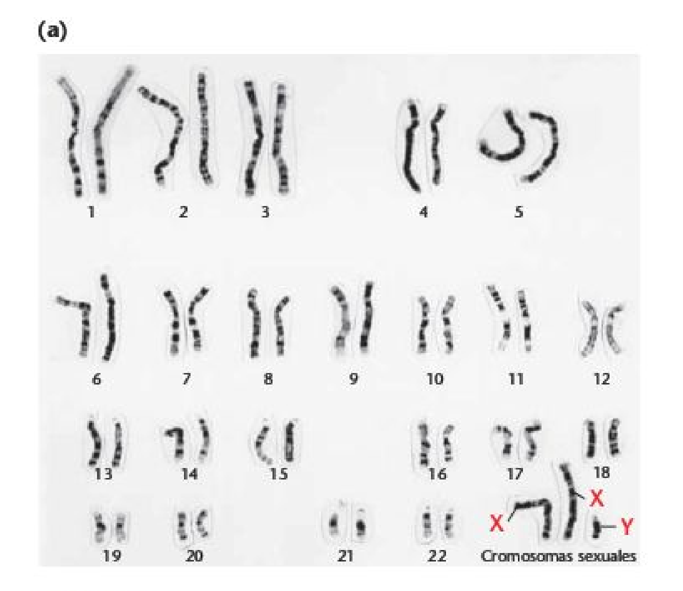
Estos cariotipos Klinefelter y Turner y sus correspondientes fenotipos sexuales nos permiten concluir que el cromosoma Y determina la masculinidad en humanos. En su ausencia, el sexo del individuo es femenino, incluso si sólo se encuentra un cromosoma X. La presencia del cromosoma Y en los individuos con síndrome de Klinefelter es suficiente para determinar la masculinidad, aun cuando no se complete el desarrollo masculino. Igualmente, en ausencia de un cromosoma Y, como el caso de los individuos con el síndrome de Turner, no se produce la masculinización.

El síndrome de Klinefelter se encuentra en unos 2 de cada 1.000 nacimientos de varones. Los cariotipos **48,XXXY**, **48,XXYY**, **49,XXXXY** y **49,XXXYY** son fenotípicamente similares al 47,XXY, pero a menudo la manifestación es mas grave en individuos con un mayor número de cromosomas X.

El síndrome de Turner puede darse también con cariotipos distintos del 45,X, incluidos los individuos llamados **mosaicos** cuyas células somáticas presentan dos líneas celulares genéticas distintas, manifestando cada una un cariotipo diferente. Tales líneas celulares son consecuencia de errores en la mitosis al principio del desarrollo, siendo las combinaciones cromosómicas mas comunes **45,X/46,XY** y **45,X/46,XX**. Así, un embrión que comience su vida con un cariotipo normal puede dar lugar a un individuo cuyas células muestren una mezcla de cariotipos y que exhiba este síndrome.

El síndrome de Turner se observa aproximadamente en 1 de cada 2000 nacimientos femeninos, una frecuencia mucho mas baja que la del síndrome de Klinefelter. Una explicación de esta diferencia es el hecho de que una sustancial mayoría de los fetos

(a)



(b)

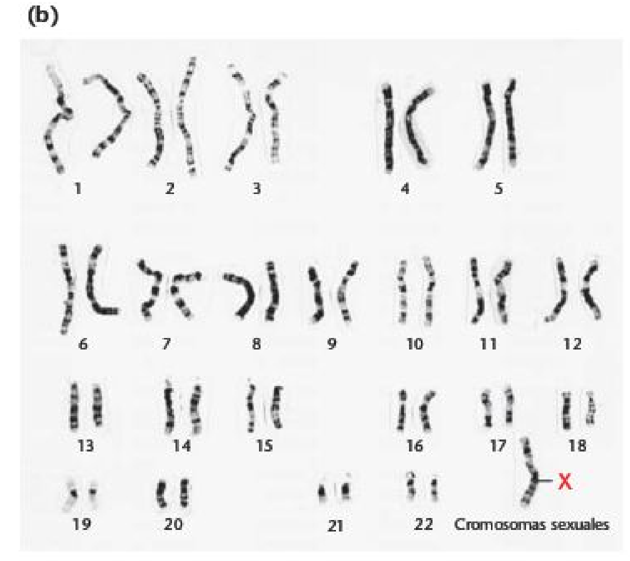


FIGURA 7.7 Los cariotipos de individuos con (a) el síndrome de Klinefelter (47,XXY) y con (b) el síndrome de Turner (45,X).

45,X mueren en el útero y sufren abortos espontáneos. Por ello, en la concepción podría darse una frecuencia similar para ambos síndromes.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la información clave, en relación con la composición de cromosomas sexuales de los individuos con los síndromes de Klinefelter y Turner, que prueba que los cromosomas X no juegan un papel en la determinación del sexo en humanos, mientras que demuestra que el cromosoma Y da lugar a la masculinidad y su ausencia origina la feminidad?

El síndrome 47,XXX

La presencia de tres cromosomas X junto con una dotación normal de autosomas (**47,XXX**) da lugar a diferenciación femenina. Este síndrome, que se estima ocurre en 1 de cada 1200 nacimientos femeninos, es muy variable en cuanto a su expresión. Frecuentemente, las mujeres 47,XXX son perfectamente normales. En otros casos, se puede dar un menor desarrollo de características sexuales secundarias, esterilidad y retraso mental. En casos raros se han encontrado cariotipos **48,XXXX** y **49,XXXXX**. Los síndromes asociados con estos cariotipos son similares, pero mas pronunciados, que los del 47,XXX. Así, en muchos casos, la presencia de un cromosoma X adicional parece trastornar el delicado equilibrio de información genética esencial para el desarrollo normal de una mujer.

Condición 47,XYY

Otra situación que implica a los cromosomas sexuales, la **47,XYY**, también se ha investigado intensamente. Los estudios de esta situación, en donde la única desviación de la diploidía es la presencia de un cromosoma Y extra en, por otra parte, un cariotipo masculino normal, han dado lugar a una interesante controversia.

En 1965, Patricia Jacobs descubrió en 9 de los 315 varones de una prisión de máxima seguridad escocesa, el cariotipo 47,XYY. Estos varones eran significativamente más altos que el promedio y habían sido encarcelados por actos criminales antisociales (no violentos). De los nueve varones estudiados, siete tenían una inteligencia por debajo de lo normal y todos sufrían desórdenes de personalidad. Otros estudios dieron resultados similares. La posible correlación entre esta composición cromosómica y un comportamiento criminal provocó un considerable interés y amplias investigaciones del fenotipo y de la frecuencia de la condición 47,XYY resultante en las poblaciones criminal y no criminal. En general se ha verificado una estatura por encima del promedio (normalmente por encima de 1,80 metros) y una inteligencia por debajo de lo normal y la frecuencia de varones que presentan este cariotipo es realmente mayor en instituciones penales y mentales comparado con varones no encarcelados. (Véase la Tabla 7.1.) Una cuestión particularmente relevante implica a las características que presentan los varones XYY no encarcelados. Casi la única asociación constante es que tales individuos tienen alrededor de 1,80 metros de estatura!

Se inició un estudio dirigido a este tema para identificar a individuos 47,XYY al nacimiento y seguir sus patrones de comportamiento durante los estadios del desarrollo juvenil y adulto. En 1994, los dos investigadores, Stanley Walzer y Park Gerald, habían identificado unos 20 recién nacidos XYY de 15.000 nacimientos en el Hospital para mujeres de Boston. Sin embargo, muy pronto tuvieron grandes presiones para abandonar su investigación. Los opuestos a su estudio argüían que la investigación podría no estar justificada y que podría causar un gran perjuicio a los individuos que manifestaran dicho cariotipo. Los oponentes argüían que (1) no se había establecido una asociación entre el cromosoma Y adicional y el comportamiento anormal en la población en conjunto, y (2) «marcar» a dichos individuos del estudio podría originar una profecía autoconcluyente. Es decir, como resultado de la participación en el estudio, los padres, parientes y amigos podrían tratar a los individuos identificados como 47,XYY de manera diferente, dando lugar finalmente a la producción del

TABLA 7.1 FRECUENCIA DE INDIVIDUOS XYY EN VARIOS ESCENARIOS

Escenario	Limitaciones	Número estudiado	Número de XYY	Frecuencia de XYY
Población control	Recién nacidos	28.366	29	0,10%
Mental-penal	Ninguna	4.239	82	1,93
Penal	Ninguna	5.805	26	0,44
Mental	Ninguna	2.562	8	0,31
Mental-penal	De estatura	1.048	48	4,61
Penal	De estatura	1.683	31	1,84
Mental	De estatura	649	9	1,38

Fuente: Compilado de los datos presentados en Hook, 1973, Tabla 1-8. Copyright 1973 por American Association for the Advancement of Science.

esperado comportamiento antisocial. A pesar del apoyo de fondos de una agencia gubernamental y de la Escuela de Medicina de Harvard, Walzer y Gerald abandonaron su investigación en 1995.

Desde el trabajo de Walzer y Gerald, está claro que muchos varones XYY presentes en la población no manifiestan comportamiento antisocial y tienen una vida normal. Por consiguiente, tenemos que concluir que no hay una correlación consistente entre el cromosoma Y extra y la predisposición de los varones a problemas de comportamiento.

Diferenciación sexual en humanos

Una vez que los investigadores establecieron que en humanos es el cromosoma Y el que alberga la información genética necesaria para la masculinidad, se hicieron esfuerzos para precisar un gen o genes específicos capaces de proporcionar la «señal» responsable de la determinación del sexo. Antes de ahondar en este tema, será útil considerar cómo se produce la diferenciación sexual a fin de comprender mejor cómo los humanos se desarrollan en varones y mujeres sexualmente dimórficos. En el desarrollo temprano, cada embrión pasa por un periodo en el que es potencialmente hermafrodita. Hacia la quinta semana de gestación, los primordios gonadales (el tejido que dará lugar a las gónadas) aparecen como un par de crestas asociados con cada riñón embrionario. Las células germinales primordiales migran a dichas crestas, en donde se forma un córtex externo y una médula interna. El **córtex** se puede desarrollar en ovario mientras que la **médula** interna se puede desarrollar en testículos. Además, en cada embrión hay dos series de conductos indiferenciados, masculinos (Wolffian) y femeninos (Mullerian).

Si las células de la cresta genital tienen una constitución XY, hacia la séptima semana se inicia el desarrollo de la región medular en testículos. Sin embargo, en ausencia del cromosoma Y, no se produce desarrollo masculino y el córtex de la cresta genital forma posteriormente tejido ovárico. Luego se produce el desarrollo paralelo de los sistemas de conductos apropiados masculinos o femeninos, y el otro sistema de conductos degenera. Un substancial número de pruebas indica que en los varones, una vez que se ha iniciado la formación de los testículos, el tejido testicular embrionario segrega dos hormonas que son esenciales para continuar la diferenciación sexual masculina.

En ausencia de desarrollo masculino, cuando se aproxima la duodécima semana de desarrollo fetal, las oogonias de los ovarios inician la meiosis y se pueden detectar oocitos primarios. Hacia la vigésima quinta semana de gestación, se detiene la meiosis en todos los oocitos y permanecen latentes hasta la pubertad, que se alcanza entre 10 y 15 años mas tarde. Por otro lado, en los varones no se forman los espermatocitos primarios hasta que se alcanza la pubertad.

El cromosoma Y y el desarrollo masculino

Durante mucho tiempo se creyó que el cromosoma Y humano, a diferencia del X, era en gran medida genéticamente nulo. Se sabe ahora que eso no es cierto, aun cuando el cromosoma Y contiene bastantes menos genes que el X. Análisis actuales han revelado numerosos genes y regiones con función genética potencial, algunos con y otros sin alelos homólogos en el cromosoma X. Por ejemplo, presentes en ambos extremos del cromosoma Y se encuentran las llamadas **regiones pseudoautosómicas** (**PAR**) que son homólogas de regiones del cromosoma X con las que establecen sinapsis y recombinan en la meiosis. La presencia de tales regiones apareantes es esencial para la segregación de los cromosomas X e Y en la gametogénesis masculina. El resto del cromosoma, aproximadamente un 95 por ciento, no establece sinapsis ni se recombina con el cromosoma X. Por ello, originalmente se denominó la *región no recombinante del Y (NRY)*. Mas recientemente, los investigadores la han designado como la **región específica del Y (MSY)**. Como se verá, algunas partes de la MSY comparten homología con genes del cromosoma X y otras no.

En la Figura 7.8 se esquematiza un cromosoma Y humano. La MSY se divide en regiones aproximadamente iguales *eucromáticas*, que contienen genes funcionales, y *heterocromáticas*, que carecen de genes. Dentro de la eucromatina, junto a la PAR del brazo corto del cromosoma Y, hay un gen esencial que controla el desarrollo sexual masculino, en la llamada **región del Y que determina el sexo (SRY)**. En humanos, la ausencia de un cromosoma Y casi siempre conduce al desarrollo femenino, ya que este gen no se encuentra en el cromosoma X. La *SRY* codifica un producto génico que de alguna manera

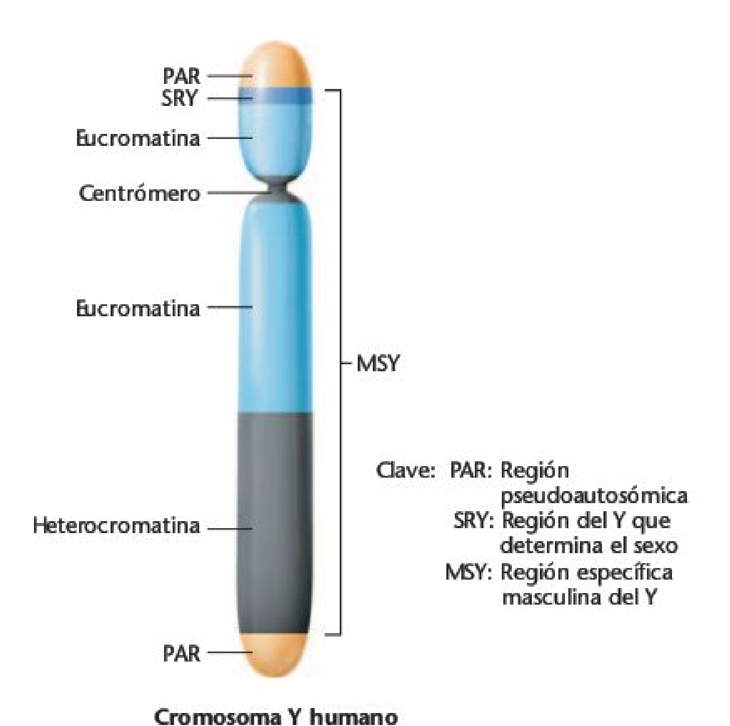


FIGURA 7.10 Casos de corpúsculos de Barr en varios cariotipos humanos, en donde todos los cromosomas X, excepto uno ($N-1$) están inactivados.

obliga al tejido indiferenciado gonadal del embrión a formar testículos. Este producto es el llamado **factor de la determinación testicular (TDF)**. La *SRY* (o una versión relacionada íntimamente) se encuentra en todos los mamíferos examinados hasta el momento, lo que es indicativo de su función esencial a lo largo de los diversos grupos de animales.

Nuestra capacidad para identificar la presencia o ausencia de secuencias de DNA en raros individuos cuya dotación de cromosomas sexuales no se corresponde con su fenotipo sexual ha proporcionado pruebas que el *SRY* es el gen responsable de la determinación sexual masculina. Por ejemplo, hay varones que tienen dos cromosomas X sin cromosoma Y. A menudo, unido a uno de sus cromosoma X se encuentra la región del Y que contiene la *SRY*. Hay también mujeres que tienen un cromosoma X y un Y. Su cromosoma Y casi siempre carece del gen *SRY*. Estas observaciones son un sólido argumento a favor del papel del *SRY* para proporcionar la señal primaria del desarrollo masculino.

Apoyos posteriores a esta conclusión son los experimentos utilizando **ratones transgénicos**. Estos animales se obtienen a partir de huevos fecundados a los que se les inyecta DNA foráneo que posteriormente se incorpora en la composición genética del embrión en desarrollo. En los ratones normales se ha identificado una región cromosómica denominada *Sry*, que es comparable a la *SRY* de humanos. Cuando se inyecta DNA de ratón, que contiene *Sry*, en óvulos de ratón normales XX, muchos de los descendientes se desarrollan como machos.

La cuestión de cómo el producto de este gen induce al tejido gonadal embrionario para que desarrolle testículos en lugar de ovarios se está investigando intensamente. En humanos, se cree que otros genes autosómicos forman parte de una cascada de expresión génica iniciada por *SRY*. Entre los ejemplos se incluyen al gen *SOX9* y a *WT1* (en el cromosoma 11), identificado inicialmente como un oncogén asociado con el tumor de Wilms, que afecta a los riñones y a las gónadas. Otro gen, el *SF1*, está implicado en la regulación de enzimas en relación con el metabolismo de los esteroides. En los ratones, este gen es activo inicialmente en las crestas genitales bisexuales, tanto masculinas como femeninas, persistiendo hasta el momento del desarrollo en que es aparente la formación de los testículos. En dicho momento, su expresión persiste en los machos, pero se extingue en las hembras. La unión entre estos distintos genes y la determinación del sexo nos acerca a una comprensión completa de cómo surgen machos y hembras en humanos.

Algunos descubrimientos recientes de David Page y sus muchos colegas han proporcionado un esquema razonablemente completo de la región MSY del cromosoma Y humano. Este trabajo, terminado en 2003, se basa en la información obtenida a través del Proyecto Genoma Humano, mediante el que se ha secuenciado el DNA de todos los cromosomas. Page ha encabezado el estudio detallado del cromosoma Y durante las pasadas décadas.

La MSY consta de unos 23 millones de pares de bases (23 Mb) y se puede dividir en tres regiones. La primera es la *región transpuesta del X*. Abarca cerca del 15 por ciento de la región MSY y derivó originalmente del cromosoma X en la evolución humana (hace unos 3 ó 4 millones de años). La región transpuesta del X es idéntica en un 99 por ciento a la región Xq21 del actual cromosoma X humano. En esta región se encuentran dos genes, ambos con homólogos en el cromosoma X.

La segunda zona se designa como la *región degenerada del X*. Abarcando cerca del 20 por ciento de la *MSY*, esta región consta de secuencias de DNA que son incluso mas lejanamente relacionadas que aquellas que se encuentran en el cromosoma X. La región degenerada del X tiene 27 genes de copia única, incluidos numerosos *pseudogenes*, cuyas secuencias han degenerado lo suficiente durante la evolución como para hacerlos no funcionales. Como con los genes presentes en la región transpuesta del X, todos comparten alguna homología con sus homólogos del cromosoma X. Estas 27 unidades genéticas incluyen 14 que pueden transcribirse, y cada una está presente como copia única. Una de estas es el gen *SRY*, que se discutió mas arriba. Otros genes de la región degenerada del X que codifican proteínas se expresan ubicuamente en todos los tejidos del organismo, pero el *SRY* se expresa sólo en los testículos.

La tercera zona, la *región amplicónica*, que abarca cerca del 30 por ciento de la MSY, incluye la mayoría de los genes íntimamente asociados con el desarrollo de los testículos. Estos genes carecen de homólogos en el cromosoma X y su expresión está limitada a los testículos. En esta región hay 60 unidades de transcripción distribuidas en 9 familias génicas, muchas representadas por copias múltiples. Los miembros de cada familia tienen secuencias de DNA casi idénticas (>98 por ciento). Cada unidad repetida es un **amplicón** y está contenido dentro de siete segmentos repartidos a lo largo de las regiones eucromáticas presentes tanto en el brazo largo como en el corto del cromosoma Y. Los genes de la región amplicónica codifican proteínas específicas para el desarrollo y funcionamiento de los testículos y los productos de muchos de estos genes están directamente relacionados con la fertilidad masculina. En general se cree que una gran parte de la esterilidad masculina en nuestras poblaciones puede estar relacionada con mutaciones en dichos genes.

Este reciente trabajo ha proporcionado un esquema comprensivo de la información genética presente en este cromosoma único. Esta información refuta claramente la llamada teoría del «terreno baldío», prevalente solo hace 20 años, que consideraba al cromosoma Y como casi vacío de información genética, excepto de uno o dos genes que condicionaban la masculinidad. El conocimiento que hemos obtenido proporciona la base para un esquema mas claro acerca de cómo se determina la masculinidad. Además, esta información proporciona claves importantes, sobre cómo se originó el cromosoma Y en la evolución humana.

Ahora resuelva esto

El Problema 7.28 de la página 209 se refiere al *SOX9*, un gen autosómico, que cuando muta parece que inhibe el desarrollo masculino normal humano.

Sugerencia: Algunos genes se activan y sintetizan su producto normal como consecuencia de la expresión de los productos de otros genes que se encuentran en distintos cromosomas —en este caso, quizá de uno que está en el cromosoma Y.

7.4 La proporción de varones y mujeres en la especie humana no es 1,0

La presencia de cromosomas sexuales heteromórficos en un sexo de una especie pero no en el otro proporciona un posible mecanismo para producir descendientes con igual proporción de machos que de hembras. Esta potencialidad depende de la segregación de los cromosoma X e Y (o Z y W) en la meiosis, de tal manera que la mitad de los gametos del sexo heterogamético recibe uno de los cromosomas y la otra mitad recibe el otro. Como vimos en la sección anterior, en los humanos, existen pequeñas regiones pseudoautosómicas de apareamiento homólogo en ambos extremos de los cromosoma X e Y. A condición de que ambos tipos de gametos tengan el mismo éxito en la fecundación y de que los dos sexos sean igualmente viables en el desarrollo, la consecuencia es una proporción de machos y hembra de uno a uno en los descendientes.

Dada la potencial producción de igual número de ambos sexos, se ha investigado la proporción real de descendientes machos y hembras y se ha denomina la **proporción de sexos**. Podemos investigarla de dos maneras. La **proporción de sexos primaria** refleja la proporción de machos y hembras de una población en el momento de la concepción. La **proporción de sexos secundaria** refleja la proporción entre los nacidos. La proporción de sexos secundaria es mucho más fácil de determinar, pero tiene la desventaja de no tener en cuenta cualquier mortalidad no proporcional embrionaria o fetal.

Cuando en 1969 se determinó la proporción de sexos secundaria en las poblaciones humanas utilizando los datos censales mundiales, se encontró que no era igual a 1. Por ejemplo, en la población blanca de los Estados Unidos la proporción de sexos secundaria es algo menor de 1,06, indicando que nacen unos 106 varones por cada 100 mujeres. (En 1995 esta proporción bajo ligeramente a algo menos de 1,05.) En la población afroamericana de los Estados Unidos la proporción era de 1,025. En otros países el exceso de nacimientos masculinos es incluso mayor que lo reflejado por estos valores. Por ejemplo, en Corea, la proporción de sexos secundaria es de 1,15.

A pesar de estas proporciones, es posible que la *proporción de sexos primaria* sea 1 y que esté alterada entre la concepción y el nacimiento. Entonces, para una proporción de sexos secundaria que excede de 1, la mortalidad femenina prenatal sería mayor que la masculina. Sin embargo, se ha examinado esta hipótesis y ha resultado falsa. De hecho, ocurre lo contrario. En un estudio del Instituto Carnegie, publicado en 1948, se determinó el sexo de unos 6.000 embriones y fetos recuperados de abortos y la mortalidad fetal fue superior en varones. De acuerdo con los datos derivados de dicho estudio, la proporción de sexos primaria en la población blanca de EE.UU. se estimó en 1,079. Se cree ahora que esta proporción es mucho mas alta —entre 1,2 y 1,6, sugiriendo que se conciben en las poblaciones humanas muchos mas varones que mujeres.

No está claro el porqué de tan importante desviación respecto de la proporción de sexos primaria de 1. Para llegar a una explicación adecuada, debemos examinar las suposiciones sobre las que se basa la proporción teórica:

1. Debido a la segregación, los varones producen igual número de esperma con X que con Y.
2. Cada tipo de esperma tiene una viabilidad y motilidad equivalentes en el tracto reproductivo femenino.
3. La superficie del óvulo es igualmente receptiva para el esperma con X o con Y.

Aunque no hay pruebas experimentales directas que contradigan cualquiera de estas suposiciones, el cromosoma Y humano es más pequeño que el cromosoma X y por consiguiente tiene menos masa. Así, se ha especulado que el esperma que lleva Y es mas móvil que el esperma que lleva X. Si esto es cierto, entonces la probabilidad de que la fecundación dé lugar a un zigoto masculino aumenta, proporcionando una explicación posible de la proporción de sexos primaria observada.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuáles son las observaciones experimentales clave que demuestran que la proporción de sexos primaria en humanos favorece mucho la concepción de varones?

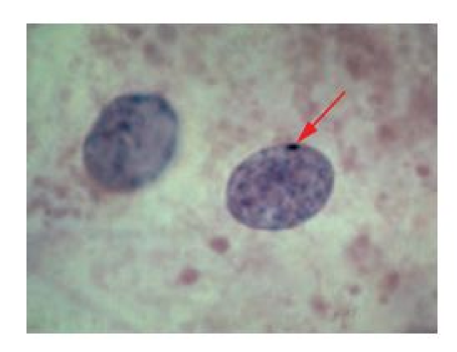
7.5 La compensación de dosis evita una expresión excesiva de los genes ligados al X en humanos y otros mamíferos

La presencia de dos cromosomas X en las mujeres normales y de un único X en los varones normales es un caso singular cuando se compara con el número igual de autosomas presentes en las células de ambos sexos. Es posible especular, sólo en teoría, que esta disparidad daría lugar a un problema de «dosis génica» entre varones y mujeres para todos los genes ligados al X. Recuerde que en el Capítulo 4 discutimos el tema del ligamiento al X, la herencia de caracteres controlados por genes

localizados en uno de los cromosomas sexuales. Entonces vimos que en la meiosis, los cromosomas sexuales, como los autosomas, están sujetos a las leyes de la segregación y de la transmisión independiente en su distribución a los gametos. Debido a que las mujeres tienen dos copias del cromosoma X y los varones sólo una, en las mujeres se da el potencial de producir el doble de producto génico de todos los genes ligados al X. Los cromosomas X adicionales que se presentan, tanto en varones como en mujeres, en varios síndromes discutidos más arriba en este capítulo, agravarían este problema de dosis incluso más. En esta sección describiremos ciertas investigaciones relativas a la expresión de los genes ligados al X que demuestran un mecanismo genético que permite una **compensación de dosis**.

Corpúsculo de Barr

Los experimentos de Murray L. Barr y Ewart G. Bertram con gatas, asi como estudios posteriores de Keith Moore y Barr en la especie humana, demostraron un mecanismos genético en mamíferos que compensa la disparidad de dosis del cromosoma X. Barr y Bertram observaron un cuerpo que se teñía de oscuro en la interfase de células nerviosas de gata, que no se encontraba en células similares de gato. En la especie humana, este cuerpo se puede demostrar fácilmente en células femeninas de la mucosa bucal (células de la mejilla) o en fibroblastos (células no diferenciadas del tejido conjuntivo), pero no en células similares de los varones (Figura 7.9). Esta estructura, muy condensada, de cerca de 1 μm de diámetro se encuentra pegada a la envoltura nuclear de células en interfase. Se tiñe positivamente con la reacción de Feulgen, una prueba citoquímica para el DNA.



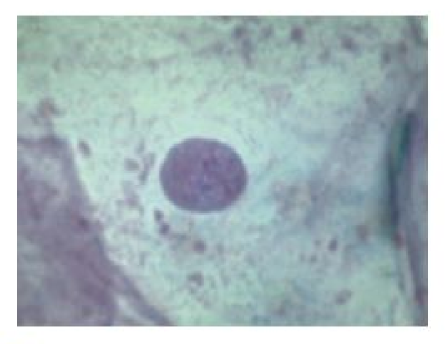


FIGURA 7.9 Fotomicrografías comparando los núcleos de células epiteliales de la boca de un varón, que no presenta corpúsculo de Barr (abajo), con una mujer que presenta un corpúsculo de Barr (indicado por una flecha en la foto superior). Esta estructura, también llamada corpúsculo de cromatina sexual, representa a un cromosoma X inactivado.

Pruebas experimentales normales demuestran que este cuerpo, llamado **corpúsculo de cromatina sexual**, o simplemente **corpúsculo de Barr**, es un cromosoma X inactivado. Susumo Ohno fue el primero en sugerir que el corpúsculo de Barr surge de uno de los dos cromosomas X. Esta hipótesis es atractiva porque proporciona un mecanismo para la compensación de dosis. Si uno de los dos cromosomas X se inactiva en las células femeninas, la dosis de información genética que se puede expresar en machos y en hembras es equivalente. Pruebas indirectas, aunque convincentes, de esta hipótesis vienen del estudio de los síndromes descritos al principio de este capítulo. Independientemente de cuantos cromosomas X haya, parece que se inactivan todos excepto uno, que se pueden observar como corpúsculos de Barr. Por ejemplo, en las mujeres Turner 45,X no se observa corpúsculo de Barr; en los varones Klinefelter 47,XXY sólo uno; dos en las mujeres 47,XXX; tres en las mujeres 48,XXXX y así sucesivamente (Figura 7.10). Por consiguiente, el número de corpúsculos de Barr sigue la regla $N - 1$, en donde N es el número total de cromosomas X presente.

Aunque este mecanismo de inactivación de todos los cromosomas X menos uno aumenta nuestra comprensión de la compensación de dosis, complica la percepción de otros aspectos. Debido a que en las mujeres normales se inactiva uno de los dos cromosoma X, ¿por qué los individuos Turner 45,X no son normales? ¿Por qué no son normales las mujeres con cariotipos triplo X y tetra X (47,XXX y 48,XXXX) por los cro-

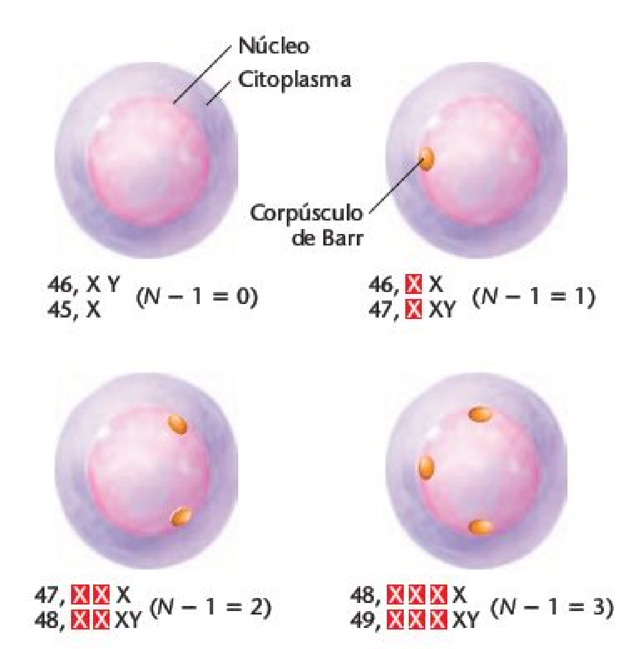


FIGURA 7.10 Casos de corpúsculos de Barr en varios cariotipos humanos, en donde todos los cromosomas X, excepto uno ($N - 1$) están inactivados.

mosomas X adicionales? Además, en el síndrome de Klinefelter (47,XXY), la inactivación del cromosoma X da lugar a que tales individuos sean 46,XY. ¿Por qué no son normales estos individuos por la presencia de un cromosoma X adicional en sus núcleos?

Una explicación posible es que la inactivación del cromosoma no ocurra normalmente en los primeros estadios del desarrollo de las células destinadas a formar el tejido gonadal. Otra explicación posible es que no todo el cromosoma X que forma el corpúsculo de Barr esté inactivado. Si alguna de estas hipótesis es correcta, todavía podría darse una excesiva expresión de ciertos genes ligados al X en momentos críticos del desarrollo, a pesar de la inactivación aparente de los cromosomas X adicionales.

La hipótesis de Lyon

En las hembras de mamíferos, un cromosoma X es de origen paterno y el otro de origen materno. ¿Cuál se inactiva? ¿Se produce la inactivación al azar? ¿Se inactiva el mismo cromosoma en todas las células somáticas? En 1961, Mary Lyon y Liane Russell propusieron, independientemente, una hipótesis que respondía a estas cuestiones. Postularon que la inactivación de los cromosomas X se produce al azar en las células somáticas en una etapa temprana del desarrollo embrionario. Además, una vez que ha ocurrido la inactivación, todas las células hijas tienen el mismo cromosoma X inactivado.

Esta explicación, que se ha venido en llamar **hipótesis de Lyon**, se basó inicialmente en la observación de hembras de ratón heterozigotas para genes del color del pelaje ligados al X. La pigmentación de dichas hembras heterozigotas era moteada, con grandes manchas que expresaban el color del alelo de uno de los X y otras manchas que expresaban el alelo del otro X. Realmente, tal patrón fenotípico se obtendría si fueran inactivos diferentes cromosomas X en las células de manchas adyacentes. Patrones en mosaico similares se producen en las manchas negras y amarillo-anaranjadas en las gatas carey y calicó (Figura 7.11). Tales patrones en el color del pelaje ligados al X no se producen en los gatos, ya que todas sus células tienen un único cromosoma X materno y por consiguiente son hemizigotos únicamente para un alelo del color del pelaje ligado al X.

La prueba mas directa en apoyo de la hipótesis de Lyon viene de estudios de la expresión génica en clones celulares de fibroblastos humanos. Después de la biopsia y de su cultivo *in vitro* se pueden aislar células. Si cada cultivo se deriva de una sola célula, se denomina **clon**. La síntesis de la enzima **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)** esta controlada por un gen ligado al X. Se han detectado numerosos alelos mutantes de este gen y sus productos génicos se pueden diferenciar de la enzima de tipo silvestre por su patrones de migración electroforética.

Se han tomado y estudiado fibroblastos de mujeres heterozigotas para diferentes formas alélicas de la G6PD. La hipótesis de Lyon predice que si la inactivación de un cromosoma X ocurre al azar en fases tempranas del desarrollo y es permanente en todas las células hijas, tales mujeres presentarán dos tipos de clones, en proporciones aproximadamente iguales, mostrando cada uno de ellos sólo una forma electroforética de la G6PD.

En 1963, Ronald Davidson y sus colegas realizaron un experimento con 14 clones de una mujer heterozigota. Siete presentaron una sola forma de la enzima y los otros siete sólo la otra forma. Lo mas importante fue que ninguno de los 14 clones presentó ambas formas de la enzima. Así, el estudio de mutantes de la G6PD proporcionó un gran apoyo a la inactivación aleatoria y permanente de un cromosoma X materno o paterno.



CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué prueba experimental apoya la idea de que la inactivación del cromosoma X materno o paterno es aleatoria en las hembras de mamífero?

(a)



(b)

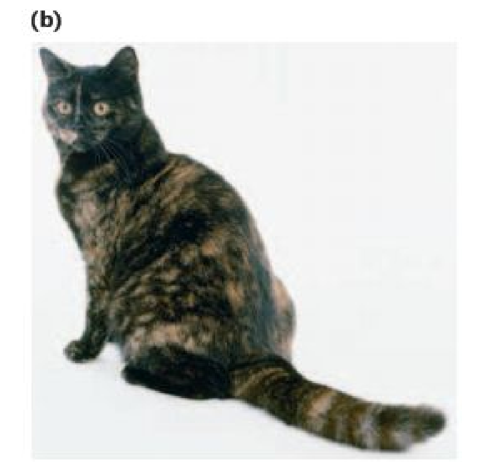


FIGURA 7.11 (a) Una gata calicó, en donde la distribución aleatoria de las manchas naranja y negras ilustra la hipótesis de Lyon. Las áreas blancas se deben a otro gen; (b) Una gata carey, que no tiene las manchas blancas que caracterizan a las calicós.

La hipótesis de Lyon se acepta en general como válida; de hecho, la inactivación de un cromosoma X en corpúsculo de Barr se denomina a veces como una **lionización**. Una ampliación de la hipótesis es que las hembras de los mamíferos son mosaicos para todos los genes heterozigotos ligados al X —algunas áreas del cuerpo expresan sólo alelos derivados de la madre y otras derivados del padre. Dos ejemplos especialmente interesantes se refieren al **daltonismo para rojo y verde** y la **displasia ectodérmica anhidrótica**, ambas son anomalías recesivas ligadas al X. En el primer caso, los varones hemizigotos son totalmente ciegos para los colores en todas las células de la retina. Sin embargo, las mujeres heterozigotas presentan retinas en mosaico con áreas de percepción defectuosa del color rodeadas de áreas de percepción normal del color. Los machos hemizigotos para la displasia ectodérmica anhidrótica presentan ausencia de dientes, crecimiento del pelo ralo y ausencia de glándulas sudoríparas. La piel de las mujeres heterozigotas para esta anomalía presentan áreas de tejido con y sin glándulas sudoríparas (Figura 7.12). En ambos ejemplos, la inactivación aleatoria de uno u otro cromosoma X en fases tempranas del desarrollo en mujeres heterozigotas da lugar a estos fenotipos.



FIGURA 7.12 Descripción de la ausencia de glándulas sudoríparas (regiones sombreadas) en una mujer heterozigota para la enfermedad displasia ectodérmica anhidrótica ligada al X. Las localizaciones varían de una mujer a otra, de acuerdo con el patrón aleatorio de inactivación del cromosoma X durante el desarrollo temprano, lo que da lugar en los heterozigotos a una distribución en mosaico única de las glándulas sudoríparas.

Ahora resuelva esto

El Problema 7.32 de la página 210 se refiere a Carbon Copy, el primer gato clonado que se obtuvo a partir de un núcleo somático de una gata calicó.

Sugerencia: El núcleo donante fue de una célula ovárica diferenciada de una gata adulta, el cual tenía inactivado uno de sus cromosomas X.

El mecanismo de la inactivación

El aspecto menos comprendido de la hipótesis de Lyon es el mecanismo de la inactivación de los cromosomas en los mamíferos. ¿Cómo se inactivan la mayoría de los genes de todo un cromosoma? Una región del cromosoma X de los mamíferos, llamada **centro de inactivación del X** (*Xic*)[3], es la unidad de control principal. La expresión genética de esta región, localizada en el extremo proximal del brazo p, se produce sólo en el cromosoma X que está inactivado. La asociación constante de la expresión de *Xic* y de la inactivación del cromosoma X apoya la conclusión de que esta región es un componente genético importante en el proceso de inactivación.

El *Xic* tiene una longitud de cerca de 1 Mb (10^6 pares de bases) y se sabe que tiene varias posibles unidades reguladores y cuatro genes. Uno de estos, el **transcrito específico del X inactivo** (***Xist***)[1], se cree que es el locus clave dentro de *Xic*. En relación con el RNA que se transcribe de este, se han hecho varias observaciones interesantes, con gran parte del trabajo realizado en el gen *Xist* del ratón. Primero, el RNA es bastante largo y carece de lo que se llama una **pauta abierta de lectura (ORF)**. Una ORF incluye la información necesaria para la traducción del RNA en proteína. Así, el RNA no se traduce, pero en su lugar tiene un papel estructural en el núcleo, probablemente en el mecanismo de inactivación cromosómica. Este hecho ha dado lugar a la especulación de que el RNA producido por *Xist* se extiende y cubre al cromosoma X que lleva el gen que lo produce, dando lugar a una especie de «jaula» molecular que lo atrapa y lo inactiva. Por consiguiente se dice que la inactivación actúa en *cis*.

Segundo, la transcripción de *Xist* se produce inicialmente a bajo nivel en todos los cromosomas X. Sin embargo, cuando comienza el proceso de inactivación, la transcripción continúa y se incrementa sólo en el cromosoma, o cromosomas, X que van a ser inactivados.

En 1996, un grupo de investigación liderado por Graeme Penny proporcionó pruebas convincentes de que la transcripción de *Xist* es el suceso decisivo en la inactivación del cromosoma. Estos investigadores pudieron provocar una deleción dirigida (7kb) en este gen que anula su actividad. En conse-

[1] En el cromosoma X humano, el centro de inactivación y el gen clave se designan como *XIC* y *XIST*, respectivamente.

cuencia, el cromosoma que lleva la mutación pierde su capacidad para inactivarse. Varias cuestiones interesantes quedan sin respuesta. Primero, en las células con más de dos cromosomas, ¿qué tipo de mecanismo existe para «calcular» qué cromosomas van a ser inactivados? Segundo, ¿qué «bloquea» al *Xic* del cromosoma activo, evitando la transcripción de *Xist*? Tercero, ¿cómo se mantiene la inactivación del mismo cromosoma o cromosomas en las células hijas, tal como predice la hipótesis de Lyon? La señal de inactivación debe ser estable a medida que las células pasan por la mitosis. Cualquiera que sean las respuesta a estas cuestiones, se ha dado un paso importante hacia la comprensión de cómo la compensación de dosis se realiza en los mamíferos.

7.6 La proporción de cromosomas X respecto de la dotación de autosomas determina el sexo en *Drosophila*

Ya que los machos y las hembras de *Drosophila melanogaster* (y de otras especies de *Drosophila*) tienen la misma composición de cromosomas sexuales que los humanos, podríamos suponer que el cromosoma Y también da lugar a la masculinidad en estas moscas. Sin embargo, el elegante trabajo de Calvin Bridges en 1916 demostró que éste no es el caso. Estudió moscas con dotaciones cromosómicas variadas y llego a la conclusión de que en este organismo el cromosoma Y no está implicado en la determinación del sexo. Por el contrario, Bridges propuso que tanto los cromosomas X como los autosomas juegan un papel decisivo en la determinación del sexo. Recuerde que en el nemátodo *C. elegans*, que carece de cromosoma Y, los cromosomas sexuales y los autosomas son también decisivos en la determinación del sexo.

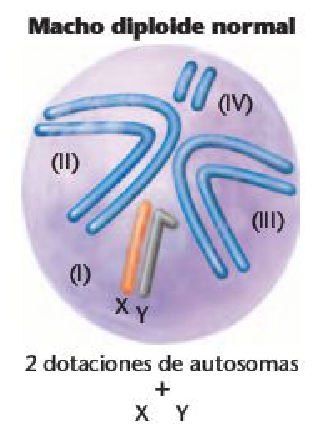
El trabajo de Bridges se puede dividir en dos fases: (1) Un estudio de los descendientes que resultan de una no disyunción de los cromosomas X en la meiosis femenina y (2) el trabajo posterior con los descendientes de hembras que tienen tres copias de cada cromosoma, llamadas hembras triploides ($3n$). Como hemos visto más arriba en este capítulo y anteriormente (véase la Figura 2.17), la no disyunción es el fallo de los cromosomas apareados para segregar o separarse en la anafase de la primera o segunda división meiótica. El resultado es la producción de dos tipos de gametos anormales, unos que tienen un cromosoma extra ($n + 1$) y otros que les falta un cromosoma ($n - 1$). La unión de tales gametos con gametos haploides da lugar a zigotos ($2n + 1$) o ($2n - 1$). Como en la especie humana, si la no disyunción implica a los cromosomas X, además de la dotación normal de autosomas, se da lugar a una dotación de cromosomas sexuales XXY o X0. (El «0» significa que no hay un segundo cromosoma X o Y.) Al contrario de lo que se descubrió posteriormente en la especie humana, Bridges encontró que las moscas XXY eran hembras normales y las moscas X0 eran machos estériles. La presencia de un cromosoma Y en las moscas XXY no daba lugar a masculinidad y su ausencia en las moscas X0 no producía feminidad. De estos datos concluyó que el cromosoma Y en *Drosophila* carece de factores determinantes de la masculinidad, pero ya que los machos X0 eran estériles, contiene información genética esencial para la fertilidad masculina.

Bridges pudo clarificar el modo de determinación del sexo en *Drosophila* estudiando la descendencia de hembras triploides ($3n$), que tienen tres copias de cada dotación haploide de cromosomas. *Drosophila* tiene un número haploide de 4, presentando tres pares de autosomas además de su par de cromosomas sexuales. Las hembras triploides se originaron aparentemente de raros óvulos diploides fecundados por un esperma haploide normal. Las hembras triploides tenían cuerpos más rollizos, y ojos y quetas más toscos y podían ser fértiles. Debido al número impar de cada cromosoma (3), en la meiosis se producen gametos con una amplia variedad de complementos cromosómicos que dan lugar a descendientes con una gran variedad de dotaciones cromosómicas anormales. La correlación entre la morfología sexual y la constitución cromosómica, y la interpretación de Bridges se presenta en la Figura 7.13.

Bridges constató que el factor crítico en la determinación del sexo es la **proporción de cromosomas X respecto del número de dotaciones autosómicas haploides (A)** presentes. Las hembras normales (2X:2A) y triploides (3X:3A) tienen una proporción igual a 1 y ambas son fértiles. Cuando la proporción excede de la unidad (por ejemplo, 3X:2A, o 1,5) se produce lo que originalmente se llamo una superhembra. Debido a que esta hembras es mas bien débil, poco fértil y tiene viabilidad reducida, se denomina, mas adecuadamente, **metahembra**.

Los machos normales (XY:2A) y estériles (X0:2A) tienen una proporción de 1:2, o 0,5. Cuando la proporción disminuye a 1:3, o 0,33, como en el caso de un macho XY:3A, se producen **metamachos** estériles. Otras moscas recuperadas por Bridges en estos estudios tenían una proporción X:A intermedia, entre 0,5 y 1. Estas moscas eran normalmente mas grandes y presentaban una serie de anormalidades morfológicas y gónadas y genitales bisexuales rudimentarios. Eran invariablemente estériles y expresaban caracteres morfológicos tanto masculinos como femeninos por lo que se denominaron **intersexos**.

Los resultados de Bridges indican que en *Drosophila*, los factores que dan lugar a que una mosca se desarrolle como macho no están localizados en los cromosomas sexuales, sino que se encuentran en los autosomas. Sin embargo, algunos factores que determinan hembra están localizados en los cromosomas X. Así, con respecto a la determinación primaria del sexo, los gametos masculinos que contienen cada uno de los autosomas más un cromosoma Y dan lugar a descendencia masculina, no debido a la presencia del Y, sino por la ausencia del cromosoma X. Este tipo de determinación del sexo se explica por la **teoría del equilibrio génico**. Bridges propuso que se alcanza un determinado umbral para la masculinidad cuando la



Dotación cromosómica	Fórmula cromosómica	Proporción de cromosomas X respecto de dotaciones autonómicas	Morfología sexual
	3X/2A	1,5	Metahembra
	3X/3A	1,0	Hembra
	2X/2A	1,0	Hembra
	3X/4A	0,75	Intersexo
	2X/3A	0,67	Intersexo
	X/2A	0,50	Macho
	XY/2A	0,50	Macho
	XY/3A	0,33	Metamacho

FIGURA 7.13 Dotaciones cromosómicas, proporción de cromosomas X respecto de dotaciones de autosomas y la morfología sexual resultante en *Drosophila melanogaster*. La dotación cromosómico del macho diploide normal se muestra como referencia a la izquierda (XY/2A).

proporción X/A es 1:2 (X:2A), pero la presencia de un X adicional (XX:2A) altera el equilibrio y da lugar a diferenciación femenina.

Se han identificado numerosos genes mutantes que están implicados en la determinación del sexo en *Drosophila*. El gen autosómico recesivo *transformer (tra)*, descubierto hace unos 50 años por Alfred H. Sturtevant, demuestra claramente que un único gen autosómico puede tener un profundo impacto en la determinación del sexo. Las hembras homozigotas para *tra* se transforman en machos estériles, mientras que los machos homozigotos no quedan afectados.

Más recientemente se ha demostrado que otro gen, el *Sex-lethal (Sxl)*, juega un papel crítico, sirviendo como «conmutador maestro» en la determinación del sexo. La activación del gen *Sxl* ligado al X, que cuenta con una proporción de cromosomas X respecto de dotaciones de autosomas igual a 1, es esencial para el desarrollo femenino. Por ejemplo, en ausencia de activación, lo que resulta una proporción de X:A igual a 0,5, se produce desarrollo masculino. Es interesante advertir que las mutaciones que inactivan al gen *Sxl*, como estudió originalmente en 1960 Hermann J. Muller, matan a los embriones femeninos, pero no tienen efecto en los embriones masculinos, lo que está de acuerdo con el papel descrito del gen.

Aunque no está todavía totalmente claro de qué manera influye esta proporción en el locus *Sxl*, se tienen algunas ideas sobre ello. El locus *Sxl* es parte de una jerarquía de expresión

génica y ejerce un control sobre otros genes, como sobre *tra* (discutido en el párrafo anterior) y *dsx* (*doublesex*), así como en otros. Sólo en las hembras se activa el alelo silvestre de *tra* por el producto de *Sxl*, que a su vez influye en la expresión de *dsx*. Dependiendo de cómo es procesado el transcrito inicial de RNA, la proteína dsx resultante activa a genes específicos de macho o de hembra que se requieren para la diferenciación sexual. Cada paso de esta cascada reguladora requiere una forma de procesado llamada de **corte y empalme del RNA**, mediante la que partes del RNA se eliminan y los fragmentos restantes se «empalman» juntos antes de su traducción en proteína. En el caso del gen *Sxl* su transcrito se puede empalmar de varios modos distintos, fenómeno llamado **empalme diferencial**. En hembras y machos se producen dos transcritos diferentes de RNA. En las futuras hembras el transcrito es activo e inicia una cascada de expresión de genes reguladores, dando lugar finalmente a la diferenciación femenina. En los futuros machos el transcrito es inactivo, dando lugar a un patrón diferente de actividad génica, por lo que se produce diferenciación masculina. Volveremos a este tema en el Capítulo 17, cuando el empalme diferencial se considere de nuevo como uno de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica en eucariotas.

Compensación de dosis en *Drosophila*

Ya que las hembras de *Drosophila* tienen dos copias de los genes ligados al X, mientras que los machos tienen una sola copia, hay un problema de dosis, como ocurre en mamíferos, como en humanos y en ratones. Sin embargo, el mecanismo de compensación de dosis en *Drosophila* difiere considerablemente del de los mamíferos, ya que no se observa inactivación del cromosoma X. En su lugar, en el macho, los genes ligados al X se transcriben a un nivel doble que los genes equivalentes de la hembra. Curiosamente, si se trasladan (translocan) grupos de genes ligados al X a los autosomas, la compensación de dosis también les afecta, incluso cuando ya no forman parte del cromosoma X.

Como en los mamíferos, recientemente se han realizado considerables avances en la comprensión del proceso de compensación de dosis en *Drosophila*. Se conocen al menos cuatro genes autosómicos implicados, controlados por el mismo gen conmutador maestro *Sxl* que induce la diferenciación femenina en la determinación del sexo. Las mutaciones en cualquiera de estos genes reducen drásticamente la mayor expresión de los genes ligados al X en los machos, produciendo letalidad.

En la actualidad se dispone de pruebas que apoyan un mecanismo de actividad génica aumentada en machos. El modelo mas aceptado propone que uno de los genes autosómicos, *mle* (*maleless*), codifica para una proteína que se une en numerosos sitios a lo largo del cromosoma X, dando lugar a un aumento de la expresión génica. Los productos de los otros tres genes autosómicos también participan y son requeridos para la unión del *mle*.

Este modelo predice que el gen conmutador maestro *Sxl* juega un papel importante en la compensación de dosis. En las moscas XY, *Sxl* es inactivo; por consiguiente, los genes autosómicos están activados, dando lugar a un incremento de la actividad del cromosoma X. Por otro lado, *Sxl* es activo en hembras XX y actúa inactivando uno o mas genes autosómicos específicos de macho, quizá el *mle*. Sofocando la actividad de estos genes autosómicos, se asegura que no actuarán para doblar la expresión génica de los genes ligados al X en las hembras, lo que agravaría el problema de la dosis.

Tom Cline ha propuesto que, antes de que se active el mencionado mecanismo de compensación de dosis, *Sxl* actúa como sensor para la expresión de otros genes ligados al X. En cierto sentido, *Sxl* cuenta los cromosomas X. Por ejemplo, cuando registra que la dosis de su expresión es alta, como consecuencia de dos cromosomas X, se modifica el producto del gen *Sxl* y sofoca la expresión de los genes autosómicos. Aunque este modelo puede modificarse o refinarse todavía, es útil como guía de investigaciones futuras.

En *Drosophila* (y probablemente en muchos organismos relacionados) claramente existe un mecanismo de compensación de dosis totalmente distinto del de los mamíferos. El desarrollo de un mecanismo complejo para igualar la expresión de los genes ligados al X demuestra la naturaleza esencial de la expresión génica. Para mantener el desarrollo normal de machos y hembras es necesario un delicado equilibrio de productos génicos.

Mosaicos en *Drosophila*

Nuestro conocimiento de la determinación del sexo y del ligamiento al X en *Drosophila* (Capítulo 4) nos ayuda a explicar la rara aparición de una mosca de la fruta excepcional, que se muestra en la Figura 7.14. Esta mosca se recuperó de una cepa en donde todas las hembras eran heterozigotas para los genes ligados al X ojos *white* (w) y alas *miniature* (m). Es un **ginandromorfo bilateral**, que significa que la mitad de su cuerpo (la mitad izquierda) se ha desarrollado como macho y la otra mitad (la mitad derecha) como hembra.

Podemos explicar la presencia de los dos sexos en una sola mosca de la siguiente manera. Si un zigoto femenino (heterozigoto para ojos *white* y alas *miniature*) perdiera uno de sus cromosomas X en la primera división mitótica, las dos células resultantes tendrían la constitución XX y X0 respectivamente. Así, una célula sería femenina y la otra masculina. Cada una de estas células es responsable de la producción de todas las células hijas que constituirán bien el lado derecho, bien el lado izquierdo, del organismo en la embriogénesis.

En el caso del ginandromorfo bilateral, la célula original de constitución X0 produjo, aparentemente, sólo células hijas idénticas y dio lugar a la mitad izquierda de la mosca que, debido a su dotación cromosómica, fue masculina. Ya que la mitad masculina presenta el fenotipo *white, miniature*, el cromosoma X que llevaba los alelos w^+ y m^+ se perdió, mientras que se retuvo al homólogo que llevaba w y m. Todas las células del lado derecho del cuerpo se derivaron de la célula original XX, dando lugar a desarrollo femenino. Estas células, que



FIGURA 7.14 Un ginandromorfo bilateral de *Drosophila melanogaster*, formado después de la pérdida de un cromosoma X en una de las dos células de la primera división mitótica. El lado izquierdo de la mosca, compuesto de células masculinas con un solo cromosoma X, expresa los alelos mutantes ojos *white* y alas *miniature*. El lado derecho está formado por células femeninas que contienen dos cromosomas X, heterozigotos para los dos alelos recesivos.

quedaron heterozigotas para ambos genes mutantes, expresaron los fenotipos silvestres de ojo y de ala.

Dependiendo de la orientación del huso en la primera división mitótica, se pueden producir ginandromorfos con la «línea» que separa el desarrollo masculino y femenino a lo largo de cualquier eje del cuerpo de la mosca.

7.7 La variación de la temperatura regula la determinación del sexo en reptiles

Concluimos este capítulo discutiendo varios casos en relación con los reptiles, en donde el ambiente, concretamente la temperatura, tiene una enorme influencia en la determinación del sexo. En contraste con la **determinación del sexo genotípica** o **cromosómica** (**GSD** o **CSD**) que abarca a todos los casos presentados hasta el momento, los casos que discutiremos ahora se clasifican como **determinación del sexo dependiente de la temperatura** (**TSD**). Como veremos, las investigaciones que condujeron a esta información pueden estar más cerca de revelar la auténtica naturaleza de las bases primarias de la determinación del sexo que cualquiera de los descubrimientos discutidos previamente.

En muchas especies de reptiles, el sexo está predeterminado en el momento de la concepción por la composición de cromosomas sexuales, como en el caso de muchos organismos ya considerados en este capítulo. Por ejemplo, en muchas serpientes, como las víboras, la forma ZZ/ZW es la normal, en donde la hembra es el sexo heterogamético. Sin embargo, en boas y pitones es imposible distinguir un cromosoma sexual de cualquier otro en ambos sexos. En lagartijas, se encuentran ambos sistemas XX/XY y ZZ/ZW, dependiendo de la especie. En otras especies de reptiles, como todos los cocodrilos, la mayoría de las tortugas y algunas lagartijas, la determinación del sexo se consigue de acuerdo con la temperatura de incubación de los huevos durante un periodo crítico en el desarrollo embrionario. Desde 1980 ha quedado claro que la TSD esta muy extendida entre los reptiles.

Curiosamente hay tres patrones distintos de TSD, como se ilustra en la Figura 7.15. En los dos primeros las bajas temperaturas producen un 100 por ciento de hembras, mientras que las altas temperaturas producen un 100 por ciento de machos (caso I), o exactamente lo contrario (caso II). En el tercer patrón (caso III) las altas *y* las bajas temperaturas dan lugar al 100 por ciento de hembras, mientras que las temperaturas intermedias producen distintas proporciones de machos. El tercer tipo se observa en varias especies de cocodrilos, tortugas y lagartijas, aunque se sabe que en otros miembros de estos grupos se presentan otros patrones. Hay dos observaciones importantes. Primero, en los tres tipos, a ciertas temperaturas, se producen

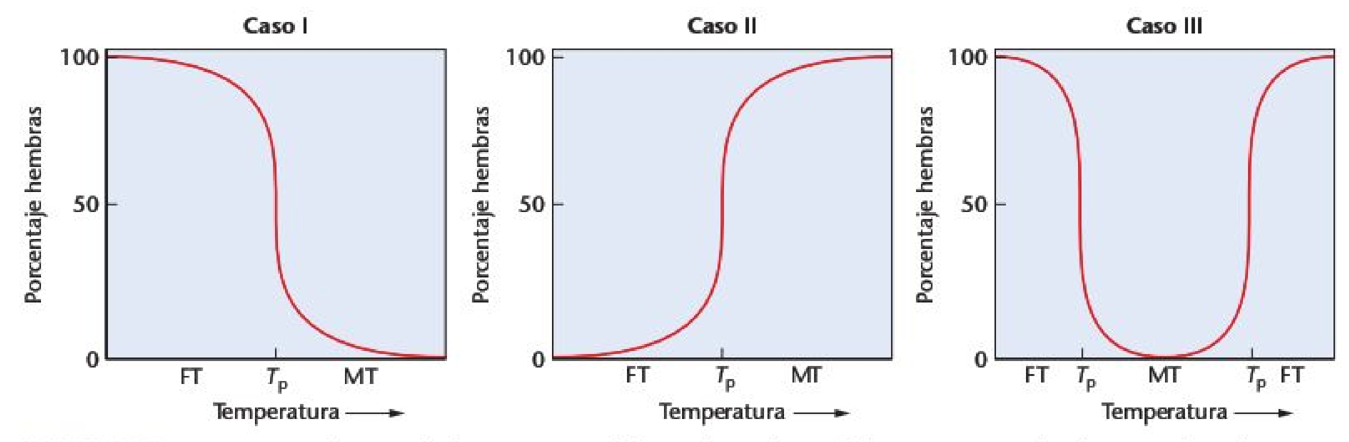


FIGURA 7.15 Tres patrones distintos de determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD) en reptiles, tal como se describe en el texto. La temperatura de inflexión relativa T_p es crucial para la determinación del sexo en un momento crítico del desarrollo embrionario (FT = temperatura de determinación femenina; MT = temperatura de determinación masculina).

descendientes tanto masculinos como femeninos. Segundo, la temperatura crítica (P) es bastante estrecha, normalmente de 5ºC y a veces de sólo 1ºC.

La cuestión central que surge de estas observaciones es ¿qué parámetros metabólicos y fisiológicos que dan lugar a la diferenciación de un sexo o del otro están siendo afectados por la temperatura? Se cree que la respuesta implica a los esteroides (principalmente estrógenos) y a las enzimas implicadas en su síntesis. Los estudios han demostrado claramente que los efectos de la temperatura sobre los estrógenos, andrógenos e inhibidores de las enzimas que controlan su síntesis están implicados en la diferenciación sexual de ovarios y testículos. Una enzima en concreto, la **aromatasa**, convierte a los andrógenos (hormonas masculinas como la testosterona) en estrógenos (hormonas femeninas como el estradiol). La actividad de estas enzimas está correlacionada con la ruta que siguen durante su actividad en la diferenciación gonadal, que es alta en los ovarios y baja en los testículos en desarrollo. Los investigadores en este campo, como Claude Pieau y sus colegas, han propuesto que un factor termosensible interviene en la transcripción del gen reptiliano de la aromatasa, lo que da lugar a una determinación del sexo dependiente de la temperatura. Es probable que estén implicados en esta intervención otros genes.

La implicación de los esteroides sexuales en la diferenciación gonadal se ha documentado también en aves, peces y anfibios. Así, los mecanismos de determinación del sexo que implican a estrógenos parece que son característicos de los vertebrados no mamíferos. La regulación de tal sistema, aunque dependiente de la temperatura en muchos reptiles, parece que está controlada por los cromosomas sexuales (XX/XY o ZZ/ZW) en muchos de esos otros organismos. Una idea final interesante sobre este asunto es que el producto del gen *SRY*, un componente clave en la determinación sexual de los mamíferos, se ha demostrado que se une *in vitro* a una parte reguladora del gene de la aromatasa, en donde podría actuar como represor del desarrollo de los ovarios.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Una cuestión de género: selección del sexo en humanos

El deseo de elegir el sexo del bebé es tan fuerte como la misma naturaleza humana. A lo largo del tiempo, la gente ha acudido a métodos variados y a veces estrafalarios para lograr el sexo preferido para sus hijos. En la Europa medieval, los padres previsores situaban un martillo debajo de la cama para ayudarles a concebir a un chico, o unas tijeras para concebir a una chica. Igualmente efectivas eran las prácticas basadas en antiguas creencias de que el semen del testículo derecho daba lugar a descendientes masculinos, y el del testículo izquierdo a descendientes femeninos. Los varones de la antigua Grecia yacían del lado derecho durante el coito para concebir a un muchacho. Hasta el siglo XVIII, los europeos ataban (o eliminaban) su testículo izquierdo para aumentar la probabilidad de tener un heredero varón.

En algunas culturas, los esfuerzos para controlar el sexo de los hijos tienen un lado oscuro —el infanticidio de las niñas. En la antigua Grecia el asesinato de bebes femeninos era tan frecuente que la proporción varón-mujer en algunas zonas se aproximaba a 4:1. Algunas sociedades, incluso en la actualidad, continúan practicando el infanticidio femenino. Se ha informado de que en algunas zonas de la India rural cientos de familias admiten practicarla, incluso hasta el década de 1990. En 1997, la Organización Mundial de la Salud publicó datos de poblaciones que demostraban que cerca de 50 millones de mujeres habían «desaparecido» en China, probablemente debido al descuido institucionalizado de las niñas. La práctica del infanticidio femenino surge de la pobreza y de antiguas tradiciones. En estas culturas, los hijos trabajan y proporcionan ingresos y seguridad, mientras que las hijas no solo no contribuyen con ingresos sino que requieren grandes dotes cuando se casan. En estas condiciones, es fácil ver porqué las mujeres mantienen una baja estima.

En tiempos recientes, los abortos específicos de sexo han sustituido bastante al tradicional infanticidio femenino. La amniocentesis y las técnicas de ultrasonidos han sido negocios lucrativos que proporcionan la determinación prenatal del sexo. Estudios en la India estiman que cada año se abortan cientos de miles de fetos debido a que son femeninos. Como consecuencia del aborto selectivo sexual, la proporción mujer:varon en la India era de 927:1.000 en 1991. En algunos estados del norte, la proporción era de hasta 600:1.000. Aunque la determinación del sexo y el aborto selectivo de fetos femeninos se declaró fuera de la Ley hacia mediados de la década de 1990 en la India y en China, se cree que la práctica continúa.

En los países industrializados occidentales, los avances en la tecnología genética y reproductiva ofrecen a lo padres modos de seleccionar el sexo de sus hijos antes de la implantación. Después de la fecundación *in vitro*, se pueden analizar los embriones y estimar su sexo. Luego serán implantados sólo embriones del sexo seleccionado. El método para la selección del sexo mas simple y menos agresivo es la selección del sexo antes de la concepción (PGS), que implica separar los espermatozoides que llevan cromosoma X de los que llevan cromosoma Y. El único método PGS efectivo diseñado hasta el momento implica separar el esperma basándose en su contenido de DNA. Debido al tamaño diferente de los cromosomas X e Y, el esperma que lleva el X tiene un 2,8-3,0 por ciento más de DNA que el esperma que lleva el Y. La muestra de esperma se tiñe con un colorante fluorescente del DNA, luego se pasa en fila india por un rayo laser en un aparato separador de células activado por fluorescencia (FACS). El aparato separa el esperma en dos porciones basándose en la intensidad de fluorescencia del DNA. Utilizando este método, se puede

separar el esperma humano en porciones con el cromosoma X y con el Y, con una riqueza del 85 por ciento y del 75 por ciento respectivamente. El esperma separado se utiliza entonces para una inseminación intrauterina normal. El Instituto de Genética e IVF (Fairfax, Virginia) está utilizando actualmente esta técnica PGS de acuerdo con los protocolos clínicos aprobados por la FDA[2]. Desde enero de 2002, se han producido 419 embarazos por este método. La compañía informa de una tasa de éxito entre el 80 y el 90 por ciento en producir el sexo deseado.

Los métodos PGS emergentes plantean una serie de aspectos éticos y legales. Algunas personas sienten que los padres previsores tienen el derecho legal de utilizar las técnicas de selección de sexo como parte de su libertad fundamental de procreación. Otros creen que esta libertad no se extiende al derecho de diseñar un hijo con las especificaciones paternas. Los proponentes indican que los beneficios que se conseguirán compensan cualquier peligro en los descendientes o en la sociedad. La utilización médica del PGS es una caso claro de beneficio. Las personas con riesgo de transmitir enfermedades ligadas al X, como la hemofilia o la distrofia muscular de Duchenne, pueden ahora aumentar la probabilidad de concebir una niña que no exprese la enfermedad. Como se conocen más de 500 enfermedades ligadas al X y se manifiestan en cerca de 1 cada 1.000 nacimientos, el PGS podría reducir mucho el sufrimiento de muchas familias.

Muchas personas se someten al PGS por razones no médicas –es decir, para «equilibrar» sus familias. Es posible que la capacidad de seleccionar intencionadamente el sexo deseado de un hijo pueda reducir la superpoblación y las cargas económicas para las familias que se reproducirían continuamente para buscar el sexo deseado. En algunos casos, el PGS puede reducir el número de abortos de fetos femeninos. Es también posible que la PGS pueden aumentar la felicidad de padres e hijos, ya que el hijo sería mas «deseado.» Por otro lado, algunos arguyen que la PGS no sirve ni para el individuo ni para el bien común. Se dice que la PGS es inherentemente sexista, basada en el concepto de la superioridad de un sexo sobre el otro y conduce a su incremento al conectar la valía de los niños al género. Algunos tienen miedo que la PGS a gran escala refuerce la discriminación sexual y conduzca a desequilibrios en la proporción de sexos. Otros sienten que el sexismo y la discriminación no están ocasionados por la proporción de sexos y sería mejor encararlas mediante la educación y medidas de igualdad económica para varones y mujeres. La experiencia hasta el momento en los países occidentales sugiere que no aparecerían desequilibrios en la proporción de sexos por la PGS. Más de la mitad de las parejas de los Estados Unidos que utilizan la PGS piden descendientes femeninos. Sin embargo, las consecuencias de la extensión de la PGS en algunos países asiáticos pueden ser mas problemáticas. Tanto en la India como en China ya hay desequilibrios en la proporción de sexos, que contribuyen a algunos efectos colaterales socialmente indeseables, tales como millones de varones adultos que no pueden casarse.

Algunos críticos al PGS arguyen que esta tecnología puede contribuir a desigualdades sociales y económicas, si está disponible sólo para aquellos que se lo puedan permitir. Otros críticos temen que la aprobación social de la PGS abra las puertas para aceptar otras manipulaciones genéticas en los hijos para características como el color de la piel o de los ojos. Es difícil predecir todos los efectos que la PGS puede traer al mundo. Pero el genio de la selección de sexo está ahora fuera de la botella y no sería deseable volverlo a meter.

[2] *Nota del traductor:* Food and Drug Administration (FDA).

Referencias

Sills, E.S., Firman, I., Thatcher, S.S. III, and Palermo, G.D. 1998. Sex-selection of human sperm atozoa: Evolution of current techniques and applications. *Arch. Gynecol. Obstet*. 261:109-115.

Robertson, J.A. 2001. Preconception Gender Selection. *Am. J. Bioethics* 1:2-9.

Sitios en la Red

Técnicas microelectivas, Genetics & IVF Institute, Faifax, Virginia.
http://www.microsort.net

Infanticidio femenino, Gendercide Watch.
http://www.gendercide.org/case_infanticide.html

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. En los organismos que se reproducen sexualmente, la meiosis, que da lugar tanto a variabilidad genética como a asegurar la constancia genética, depende de la fecundación. La fecundación depende en último término de alguna forma de diferenciación sexual, que se consigue mediante una serie de mecanismos de determinación del sexo.
2. Las bases genéticas de la diferenciación sexual normalmente está relacionada con dotaciones cromosómicas diferentes en los dos sexos. El sexo heterogamético carece de un cromosoma o tiene un cromosoma especial heteromórfico, denominado normalmente cromosoma Y.
3. En la especie humana, el estudio de individuos con dotaciones cromosómicas sexuales alteradas ha establecido que el cromosoma Y es el responsable de la diferenciación masculina. La ausencia del cromosoma Y da lugar a la diferenciación femenina. Estudios similares en *Drosophila* han excluido que el Y tenga algún papel, en su lugar han demostrado que el factor decisivo es un equilibrio entre el número de cromosomas X y el número de dotaciones autosómicas.
4. En la especie humana la proporción de sexos primaria favorece sustancialmente a los varones en la concepción. Durante el desarrollo embrionario y fetal, la mortalidad masculina es superior a la femenina. La proporción de sexos secundaria al nacimiento favorece a los varones por un pequeño margen.
5. El mecanismo de compensación de dosis limita la expresión de los genes ligados al X en las hembras, que tienen dos cromosomas X, cuando se compara con la de los machos, que tienen un solo cromosoma X. En los mamíferos, la compensación se consigue por la inactivación en el desarrollo de cualquiera de los cromosomas X materno o paterno. Este proceso da lugar a la

formación del corpúsculo de Barr en las células somáticas femeninas. En *Drosophila*, la compensación se consigue por estimulación de los genes localizados en el único cromosoma X de los machos, doblando su expresión genética.

6. La hipótesis de Lyon afirma que al comienzo del desarrollo, la inactivación es aleatoria entre los cromosomas X materno y paterno. Todas las células hijas posteriores inactivan el mismo cromosoma X que la célula progenitora. Por ello, las hembras de mamífero desarrollan mosaicos genéticos respecto de la expresión de alelos heterozigotos ligados al X.

7. En muchos reptiles, la temperatura de incubación en un momento crítico de la embriogénesis es responsable a menudo de la determinación del sexo. La temperatura influye en la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo de esteroides relacionados con la diferenciación sexual.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. En *Drosophila*, los cromosomas X pueden quedar unidos $(\widehat{XX})$ de tal manera que siempre segregan juntos. Algunas moscas tienen tanto los cromosomas X unidos como un cromosoma Y.

¿Qué sexo tendría tal mosca? Explique por qué.

Solución: Las moscas serían hembras. La proporción de cromosomas X respecto de dotaciones de autosomas sería 1, dando lugar al desarrollo de hembras normales. En *Drosophila* el cromosoma Y no tiene influencia en la determinación del sexo.

Dada esta respuesta, prediga el sexo de los descendientes que saldrían del cruce entre esta mosca y otra normal del sexo opuesto.

Solución: Todas las moscas tendrían dos dotaciones de autosomas, pero individualmente tendrían las siguientes composiciones de cromosomas sexuales:

(1) $(\widehat{XX})$ X $\rightarrow$ una metahembra con tres cromosomas X (trisómica)
(2) $(\widehat{XX})$ Y $\rightarrow$ una hembra como su madre
(3) XY $\rightarrow$ un macho normal
(4) YY $\rightarrow$ no se produce desarrollo

Si se permite que los descendientes mencionados se crucen entre sí, ¿cuál sería el resultado?

Solución: Se formaría una cepa que generaría hembras con los cromosomas X unidos generación tras generación.

2. El antígeno de la superficie celular X*g* esta codificado por un gen localizado en el cromsoma X. No hay gen homólogo en el cromosoma Y. Se han identificado dos alelos codominantes de este gen: *Xg1* y *Xg2*. Una mujer de genotipo *Xg2/Xg2* que se casó con un varón de genotipo *Xg1*/Y, tuvieron un hijo con el síndrome de Klinefelter con genotipo *Xg1/Xg2*Y. Utilizando la termología genética adecuada, explique brevemente como se originó dicho individuo. ¿En qué padre y en qué división meiótica ocurrió el error?

Solución: Debido a que el hijo con el síndrome de Klinefelter es *Xg1/Xg2*Y, tiene que haber recibido tanto el alelo *Xg1* como el cromosoma Y de su padre. Por consiguiente, la no disyunción tuvo que ocurrir en la meiosis I del padre.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Como términos relacionados con la determinación del sexo, ¿qué significan (a) cromosomas homomórficos y heteromórficos y (b) organismos isógamos y heterógamos?
2. Compare el ciclo biológico de una planta, como *Zea mays*, con el de un animal, como *C. elegans*.
3. Discuta el papel de la diferenciación sexual en los ciclos biológicos de *Chlamydomonas*, *Zea mays* y *C. elegans*.
4. Distinga entre los conceptos de diferenciación sexual y determinación sexual.
5. Compare los tipos de determinación sexual *Protenor* y *Lygaeus*.
6. Describa las diferencias principales entre la determinación del sexo en *Drosophila* y en la especie humana.
7. ¿Qué observaciones (pruebas) específicas apoyan las conclusiones que ha deducido acerca de la determinación del sexo en *Drosophila* y en la especie humana?
8. Describa cómo la no disyunción en los gametos femeninos humanos puede dar lugar a descendientes con los síndromes de Turner y de Klinefelter después de ser fecundado por un gameto masculino normal.
9. Se descubrió una especie de insecto en la que se desconocía el sexo heterogamético. Se descubrió una mutación recesiva ligada al X para *reduced wing* (*rw*). Compare las generaciones F_1 y F_2 del cruce entre una hembra con alas reducidas y un macho con alas normales (a) si la hembra es el sexo heterogamético; (b) si el macho es el sexo heterogamético.
10. Basándose en su respuesta al problema 9, ¿es posible distinguir entre el tipo de determinación del sexo *Protenor* y *Lygaeus* basándose en el resultado de estos cruces?
11. Cuando las vacas tienen gemelos de sexo distinto (gemelos fraternos), la hembra hija normalmente es estéril y tiene los órganos reproductivos masculinizados. Dicha hembra se refiere como hermafrodita. En las vacas, las hembras pueden tener una placenta común y por ello compartir circulación fetal. Prediga porqué se desarrolla un hermafrodita.

12. Una mosca hembra con los cromosomas X unidos, $\widehat{XX}Y$ (vea el apartado de «Ideas y soluciones»), expresa el fenotipo recesivo ligado al X de ojo *white*. Se cruza con un macho que expresa el fenotipo recesivo ligado al X alas miniatura. Determine el resultado de este cruce en relación con el sexo, el color del ojo y el tamaño del ala de los descendientes.

13. Suponga que, raramente, los cromosomas X unidos se desenganchan en los gametos de una hembra. Basándose en los fenotipos paternos del problema 12, ¿qué resultados de la generación F_1 indicarían que esto ha ocurrido en la meiosis de la hembra?

14. Se ha sugerido que cualquier gen que determina masculinidad que se encuentre en el cromosoma Y de la especie humana no puede estar localizado en la pequeña región que hace sinapsis con el cromosoma X en la meiosis. ¿Cuál sería el resultado si tales genes estuvieran localizados en dicha región?

15. ¿Qué es un corpúsculo de Barr y dónde se encuentra en la célula?

16. Indique el número esperado de corpúsculos de Barr en células en interfase de los siguientes individuos: con el síndrome de Klinefelter; con el síndrome de Turner; con los cariotipos 47,XYY, 47,XXX y 48 XXXX.

17. Defina la hipótesis de Lyon.

18. ¿Se puede comprobar la hipótesis de Lyon en mujeres homozigotas para un alelo del gen G6PD ligado al X? ¿Por qué sí o por qué no?

19. Prediga el posible efecto de la hipótesis de Lyon en la retina de una mujer heterozigota para el daltonismo ligado al X.

20. Los criadores de gatos saben que los gatitos que expresan el patrón de pelaje ligado al X calicó y carey son invariablemente hembras. ¿Por qué?

21. ¿Qué sugiere la aparente necesidad del mecanismo de compensación de dosis acerca de la expresión de la información genética en individuos diploides normales?

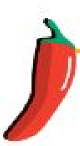
22. El equiúrido marino *Bonellia viridis* es un caso extremo de influencia del ambiente en la determinación del sexo. Las larvas no diferenciadas permanecen de vida libre y se diferencian como hembras o se sitúan en la proboscis de una hembra adulta y se convierten en machos. Si se retiran las larvas que han permanecido en la proboscis de una hembra durante un corto periodo de tiempo y se sitúan en agua de mar, se diferencian como intersexos. Si se obliga a las larvas a desarrollarse en un acuario en donde se han situado trozos de proboscis, se desarrollan como machos. Compare este método de diferenciación sexual con el de los mamíferos. Sugiera experimentos para aclarar el mecanismo de la determinación del sexo en *B. viridis*.

23. ¿Cómo sabemos que la proporción primaria de sexos en la especie humana está entre 1,4 y 1,6?

24. Diseñe tantas hipótesis como pueda para explicar porqué hay más concepción de varones que de mujeres.

25. En los ratones, el gen *Sry* (véase la Sección 7.3) está localizado en el cromosoma Y, muy próximo a una de las regiones pseudoatosómicas que se emparejan con el cromosoma X en la meiosis masculina. De acuerdo con esta información, proponga un modelo que explique la generación excepcional de machos con dos cromosomas X (con un trozo del cromosoma Y, que contiene al gen *Sry*, unido a un cromosoma X).

26. Los genes que codifican las proteínas oculares humanas que detectan los colores rojo y verde están localizados próximos en el cromosoma X y probablemente aparecieron en la evolución a partir de un gen común ancestral para pigmento. Las dos proteínas tienen una homología del 76 por ciento en cuanto a su secuencia de aminoácidos. Una mujer de visión normal con una copia de cada gen en cada uno de sus cromosomas X tiene un hijo ciego para los colores, en el que se ha demostrado que tenía una copia del gen para verde y no tenía el gen para el rojo. Explique a nivel cromosómico (en la meiosis) como se explica este hecho.



Problemas extra-picantes

27. En el ratón, la mutación *Testicular feminization* (*Tfm*) ligada al X, elimina la respuesta normal de la hormona del testículo testosterona en la diferenciación sexual. Un ratón XY, que lleva el alelo *Tfm* en el cromosoma X, desarrolla testículos, pero no desarrolla diferenciación masculina —los genitales externos de tal animal son femeninos. A partir de esta información, ¿qué se podría concluir acerca del papel del producto del gen *Tfm* y de los cromosomas X e Y en la determinación y diferenciación del sexo en los mamíferos? ¿Puede diseñar un experimento, asumiendo que puede utilizar «ingeniería genética» en los cromosomas del ratón, para comprobar y confirmar su explicación?

28. La displasia campomélica (CDM1) es un síndrome congénito en la especie humana que da lugar a la malformación de huesos y cartílagos. Está ocasionada por una mutación dominante autosómica de un gen localizado en el cromosoma 17. Considere las siguientes observaciones en secuencia y, en cada caso, extraiga cualesquiera conclusiones apropiadas posibles.

(a) De los que padecen el síndrome y son cariotípicamente 46,XY, aproximadamente el 75 por ciento tienen invertido el sexo, mostrando una amplia variedad de características femeninas.

(b) La forma no mutante del gen, llamado *SOX9*, se expresa en las gónadas en desarrollo de los varones XY, pero no en las mujeres XX.

(c) El gen *SOX9* comparte un 71 por ciento de homología de la secuencia codificada de aminoácidos con el gen *SRY* ligado al Y.

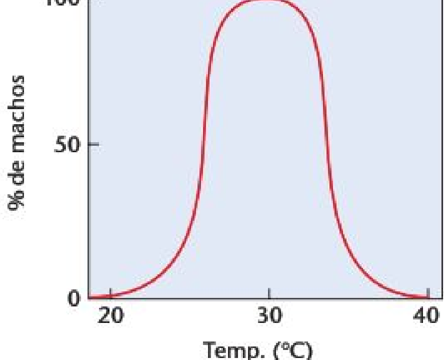
(d) Los pacientes de la CDM1 que presentan un cariotipo 46,XX se desarrollan como mujeres, sin anormalidades en las gónadas.

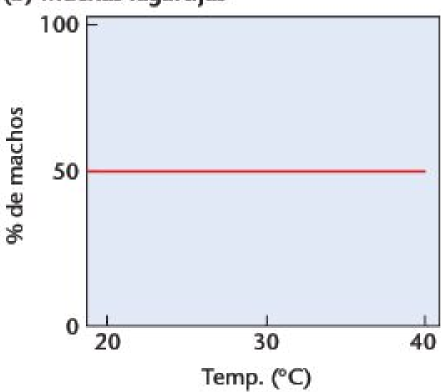
29. En la avispa *Bracon hebetor*, no es raro que aparezca una forma de partenogénesis (en donde los huevos no fecundados inician el desarrollo) en individuos haploides. Todos los individuos haploides son machos. Cuando aparecen descendientes de hembras fecundadas, casi invariablemente son hembras. P.W. Whiting ha demostrado que un gen ligado al X, con nueve alelos (X_a, X_b, etc.), controla la determinación del sexo. Cualquier situación de homozigosis o hemizigosis da lugar a machos, mientras que cual-

quier situación de heterozigosis da lugar a hembras. Si una hembra X_a/X_b que se cruza con un macho X_a pone el 50 por ciento de los huevos fecundados y el otro 50 por ciento sin fecundar, ¿qué proporción de machos y hembras habrá entre los descendientes?

30. En la columna de la derecha se presentan dos gráficos que representan el porcentaje de machos que aparecen respecto de la temperatura atmosférica durante el desarrollo temprano de huevos fecundados en (a) tortugas chiquiguao y en (b) muchas lagartijas. Interprete estos datos en cuanto a su relación con el efecto de la temperatura sobre la determinación del sexo.







31. CC (Carbon Copy), el primer gato clonado, se originó a partir de una célula ovárica tomada de su donante genético Rainbow. Se extrajo el núcleo diploide de la célula y se introdujo en un óvulo enucleado. Entonces se permitió que el zigoto resultante se desarrollara en una placa de Petri y el embrión clonado se implantó en el útero de una gata adoptiva, que dio lugar a CC. Rainbow es una gata calicó. La madre adoptiva era una gata atigrada. Los genéticos estuvieron muy interesados en el resultado de la clonación del gato calicó, ya que no estaban seguros de si el gato tendría machas naranjas y negras, solo naranjas o solo negras. Teniendo en cuenta la hipótesis de Lyon explique las bases de la incertidumbre.



Carbon Copy con su madre adoptiva.

32. Supongamos que Carbon Copy (véase el Problema 31) es realmente un calicó con manchas negras y naranja, que junto con las manchas blancas caracterizan a una gata calicó. ¿Se esperaría que CC fuera idéntico a Rainbow? Explique por qué sí o porqué no.

33. Cuando nació Carbon Copy (véase el Problema 31), tenía manchas negras y manchas blancas, pero carecía totalmente de manchas naranja. Los estudiantes de genética inteligentes no se sorprendieron de este resultado. Comenzando con la célula somática ovárica utilizada como origen del núcleo en el proceso de clonación, explique por qué se produjo este resultado.

LECTURAS SELECCIONADAS

Amory, J.K., et al. 2000. Klinefelter's syndrome. *Lancet* 356:333–35.

Avner, P., and Heard, E. 2001. X-chromosome inactivation: Counting, choice, and initiation. *Nature Reviews* 2:59-67.

Burgoyne, P.S. 1998. The mammalian Y chromosome: A new perspective. *Bioessays* 20:363-66.

Carrel, L., and Willard, H.F. 1998. Counting on Xist. *Nature Genetics* 19:211-12.

Court-Brown, W.M. 1968. Males with an XYY sex chromosome complement. *J. Med. Genet.* 5:341-59.

Davidson, R., Nitowski, H., and Childs, B. 1963. Demonstration of two populations of cells in human females heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:481-85.

Erickson, J.D. 1976. The secondary sex ratio of the United States, 1969-71: Association with race, parental ages, birth order, paternal education and legitimacy. *Ann. Hum. Genet.* (London) 40:205-12.

Hodgkin, J. 1990. Sex determination compared in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Nature* 344:721-28.

Hook, E.B. 1973. Behavioral implications of the humans XYY genotype. *Science* 179:139-50.

Irish, E.E. 1996. Regulation of sex determination in maize. *BioEssays* 18:363-69.

Jacobs, P.A., et al. 1974. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann. Hum. Genet.* 37:359-76.

Jegalian, K., and Lahn, B.T. 2001. Why the Y is so weird. *Sci. Am.* (Feb.) 284:56-61.

Koopman, P., et al. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117–21.

Lahn, B.T., and Page, D.C. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-80.

Lucchesi, J. 1983. The relationship between gene dosage, gene expression, and sex in *Drosophila*. *Dev. Genet.* 3:275-82.

Lyon, M.F. 1972. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47:1-35.

———. 1988. X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am. J. Hum. Genet.* 42:8-16.

———. 1998. X-chromosome inactivation spreads itself: Effects in autosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 63:17-19.

McMillen, M.M. 1979. Differential mortality by sex in fetal and neonatal deaths. *Science* 204:89-91.

Penny, G.D., et al. 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379:131-37.

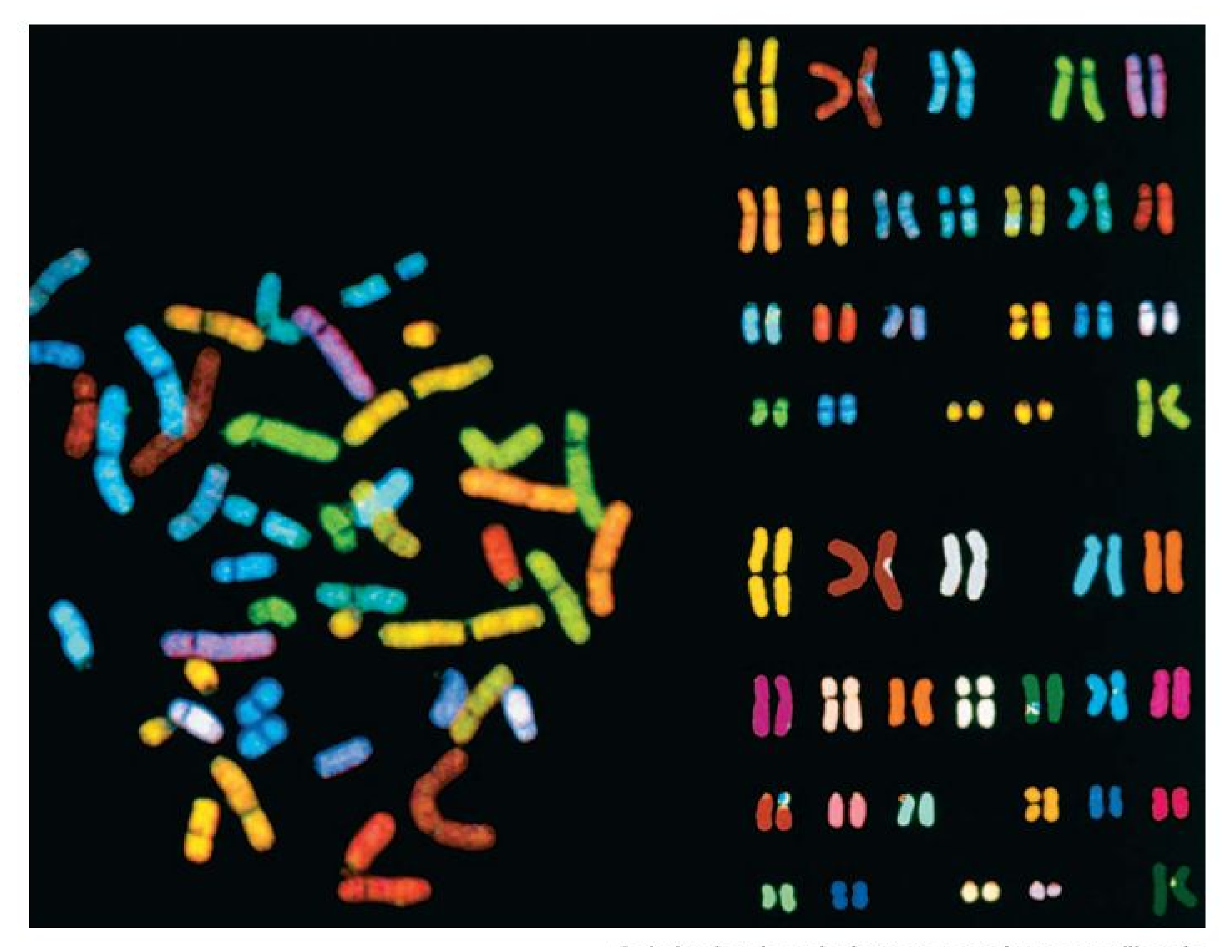
Pieau, C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18:19-26.

Westergaard, M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv. Genet.* 9:217-81.

Whiting, P.W. 1939. Multiple alleles in sex determination in *Habrobracon*. *J. Morphology* 66:323-55.

Witkin, H.A., et al. 1996. Criminality in XYY and XXY men. *Science* 193:547-55.

Mutaciones cromosómicas: variación en el número y ordenación de los cromosomas



Cariotipado coloreado de cromosomas humanos utilizando sondas que marcan diferencialmente «pintando».

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- En la meiosis, el fallo de los cromosomas en separarse adecuadamente conduce a la variación en el contenido de cromosomas de los gametos, y posteriormente en los descendientes que surgen de tales gametos.
- A menudo los vegetales toleran un contenido anormal de información genética, pero manifiestan fenotipos únicos. Tal variación genética ha sido un factor importante en la evolución de los vegetales.
- En los animales, la información genética tiene un delicado equilibrio, en donde la ganancia o pérdida de un cromosoma, o de parte de un cromosoma, en un organismo diploide conduce a menudo a la letalidad o a un fenotipo anormal.
- La reordenación de la información genética en el genoma de un organismo diploide se puede tolerar, pero puede afectar a la naturaleza de los gametos y de los fenotipos de los organismos que surgen de dichos gametos.
- Se sabe que los cromosomas tienen regiones susceptibles de romperse en condiciones concretas, conocidas como sitios frágiles, que dan lugar a fenotipos anormales.

Hasta el momento, hemos subrayado de qué manera las mutaciones y los alelos resultantes afectan al fenotipo de un organismo y cómo pasan los caracteres de padres a hijos de acuerdo con los principios mendelianos. En este capítulo estudiaremos la variación fenotípica que se produce como consecuencia de cambios que son mas importantes que la alteración de genes concretos —modificaciones al nivel de los cromosomas.

Aunque la mayoría de los miembros de las especies diploides tienen exactamente dos dotaciones haploides de cromosomas, se conocen muchos casos de variación de este patrón. Las modificaciones incluyen cambios en el número total de cromosomas, la duplicación o deleción de genes o de segmentos de un cromosoma y la reordenación del material genético dentro o entre cromosomas. En conjunto, tales cambios se denominan **mutaciones cromosómicas** o **aberraciones cromosómicas**, para distinguirlos de las mutaciones génicas. Ya que, de acuerdo con las leyes mendelianas, el cromosoma es la unidad de transmisión genética, las aberraciones cromosómicas se transmiten a los descendientes de una manera predecible, dando lugar a muchos resultados genéticos únicos.

Ya que el componente genético de un organismo está equilibrado delicadamente, incluso pequeñas alteraciones bien del contenido o de la localización de la información genética dentro del cromosoma puede dar lugar a alguna forma de variación fenotípica. Cambios muy sustanciales pueden ser letales, especialmente en animales. A lo largo del capítulo consideraremos muchos tipos de aberraciones cromosómicas, las consecuencias fenotípicas para el organismo que las posee y el impacto de la aberración en los descendientes de los individuos afectados. También discutiremos el papel de las aberraciones cromosómicas en la evolución.

8.1 Terminología específica que describe las variaciones en el número de cromosomas

La variación en el número de cromosomas va desde la adición o pérdida de uno o más cromosomas a la adición de una o más dotaciones haploides de cromosomas. Antes de embarcarnos en nuestra discusión, es útil aclarar la terminología que describe tales cambios. En la situación conocida como **aneuploidía**, un organismo gana o pierde uno o más cromosomas, pero no una dotación completa. La pérdida de un solo cromosoma en un genoma diploide se llama *monosomía*. La ganancia de un cromosoma da lugar a la *trisomía*. Tales cambios contrastan con la situación de **euploidía**, en donde están presentes dotaciones haploides completas de cromosomas. Si hay mas de dos dotaciones, el término que se aplica es **poliploidía**. Los organismos con tres dotaciones son concretamente *triploides*; con cuatro dotaciones *tetraploides,* y así sucesivamente. La Tabla 8.1 proporciona un compendio organizado para poder seguirlo cuando discutamos cada uno de los tipos y subtipos de aneuploidías y euploidías.

Tabla 8.1 Terminología para la variación en el número de cromosomas

Término	Explicación
Aneuploidías	$2n \pm x$ cromosomas
Monosmía	$2n - 1$
Trisomía	$2n + 1$
Tetrasomía, pentasomía, etc.	$2n + 2$, $2n + 3$, etc.
Euploidías	Múltiplos de n
Diploidía	$2n$
Poliploidía	$3n$, $4n$, $5n$, ...
Triploidía	$3n$
Tetraploidía, pentaploidía, etc.	$4n$, $5n$, etc.
Autopoliploidía	Múltiplos del mismo genoma
Alopoliploidía (Anfidiploidía)	Múltiplos de genomas distintos

8.2 La variación en el número de cromosomas se origina por una no disyunción

Cuando consideramos los casos de ganancia o pérdida de cromosomas, es útil examinar cómo se originan tales aberraciones. Por ejemplo, ¿cómo aparecen los síndromes en donde el número de cromosomas sexuales en la especie humana está alterado? Como se recordará del Capítulo 7, a pesar de que en las células somáticas hay un mecanismo que inactiva a todos los cromosomas X menos uno, la ganancia (47,XXY) o la pérdida (45,X) de un cromosoma sexual en genoma diploide altera el fenotipo normal, dando lugar a los síndromes de **Klinefelter** o de **Turner**, respectivamente. (Véase la Figura 7.7.) También se sabe que hay mujeres que tienen cromosomas X extra (p.e. 47,XXX, 49,XXXX), y varones que tienen un cromosoma Y extra (47,XYY).

Tal variación cromosómica se origina como un error aleatorio durante la producción de gametos. Como se introdujo en el Capítulo 2, la **no disyunción** es el fallo de los cromosomas o de las cromátidas en separarse y desplazarse a los polos opuestos en la división. Cuando esto ocurre en la meiosis, se desbarata la distribución normal de los cromosomas en los gametos. En la Figura 8.1 se muestran los resultados de una no disyunción en las meiosis I y II para un cromosoma en un organismo diploide. Como se puede ver, el cromosoma afectado puede dar lugar a gametos anormales con dos miembros o con ninguno. La fecundación de estos con un gameto haploide normal da lugar a zigotos con tres miembros (trisomía) o con sólo

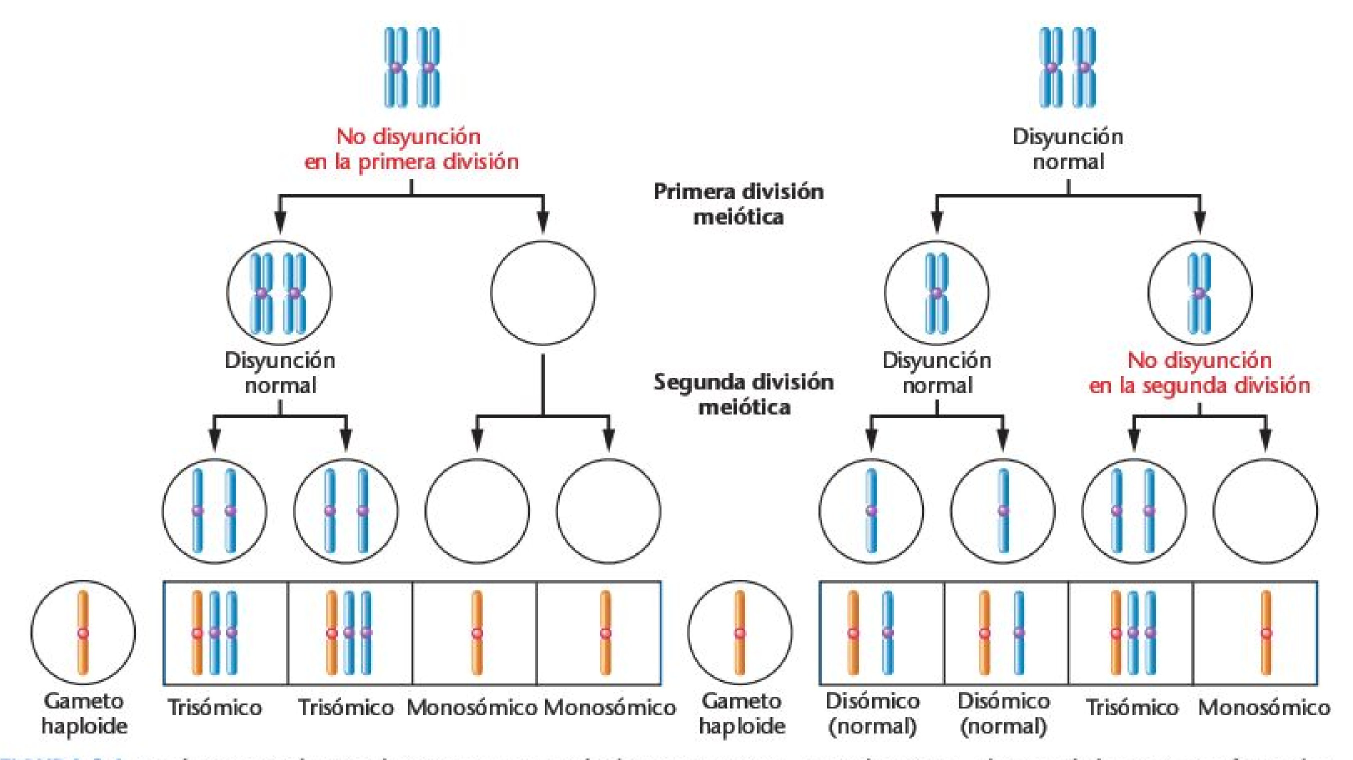


FIGURA 8.1 No disyunción durante la primera y segunda división meiótica. En ambos casos, algunos de los gametos formados tienen bien dos miembros de algún cromosoma dado o carecen de dicho cromosoma. Después de la fecundación con un gameto haploide normal, se producen zigotos monosómicos, disómicos (normales) y trisómicos.

uno (monosomía) de este cromosoma. La no disyunción da lugar a una serie de situaciones aneuploides autosómicas en la especie humana y en otros organismos.

Ahora resuelva esto

En el Problema 8.15 de la página 240 se considera a una mujer con el síndrome de Turner que presenta hemofilia, como su padre. Se le pregunta cual de los padres fue responsable de la no disyunción que dio lugar a su síndrome.

Sugerencia: El padre que contribuyo con un gameto con un cromosoma X experimentó una meiosis normal.

8.3 La monosomía, o pérdida de un solo cromosoma, puede tener graves efectos fenotípicos

Volvemos ahora a considerar la variación en el número de autosoma y a las consecuencias genéticas de tal cambio. Los ejemplos más corrientes de aneuploidía, cuando un organismo tiene un número de cromosomas distinto del múltiplo exacto de dotaciones haploides, son los casos en los que un único cromosoma se añade o se pierde de la dotación diploide normal. La pérdida de un cromosoma da lugar a un complemento $2n - 1$ y se llama **monosomía**.

Aunque la monosomía para los cromosomas X se da en la especie humana, como hemos visto en el síndrome de Turner 45,X, normalmente no se tolera la monosomía para cualquiera de los autosomas en la especie humana o en los animales. En *Drosophila*, las moscas monosómicas para el diminuto cromosoma 4 —situación que se denomina **Haplo-IV**— sobreviven, pero se desarrollan mas lentamente, presentan una reducción del tamaño corporal y tienen viabilidad reducida. El cromosoma 4 no tiene más del 5 por ciento del genoma de *Drosophila*. La monosomía para los grandes cromosomas 2 y 3 es aparentemente letal, ya que nunca se han recuperado tales moscas.

La incapacidad para sobrevivir de los individuos monosómicos en muchas especies animales es, a primera vista, completamente desconcertante, ya que al menos hay una copia de cada gen en el homólogo restante. Una explicación posible se refiere al desenmascaramiento de letales recesivos que son tolerados en los heterozigotos que llevan los correspondientes alelos silvestres. Si un organismo heterozigoto para un solo gen letal recesivo pierde el cromosoma homólogo que lleva el alelo normal (que evita la letalidad), el cromosoma desapareado dará lugar a la muerte del organismo. Otra explicación posible es que la expresión de la información genética en el desarrollo temprano está regulada cuidadosamente, de tal manera que se requiere un delicado equilibrio de los productos génicos para asegurar el desarrollo normal. Mientras se cree que esto es así en el desarrollo animal, tal requerimiento no parece ser tan exi-

Seminario Web 8.1
Separación de cromosomas en la meiosis: disyunción

gente en el reino vegetal, en donde la aneuploidía está tolerada. En el maíz, en el tabaco, en la hierba del asno *Oenothera* y en el estramonio espinoso *Datura*, entre otras plantas, se ha observado monosomía para autosomas. No obstante, tales plantas monosómicas son casi siempre menos viables que las diploides de donde provienen. Ya que tanto los granos de polen como los óvulos tienen que sufrir un amplio desarrollo después de la meiosis, pero antes de participar en la fecundación, son particularmente sensibles a la pérdida de un cromosoma y raramente son viables.

Monosomía parcial en la especie humana: el síndrome *Cri-du-chat*

En la especie humana no se han documentado monosomías autosómicas más allá del nacimiento. Es indudable que se conciben individuos con tales dotaciones cromosómicas, pero aparentemente no sobreviven al desarrollo embrionario y fetal. Sin embargo, hay casos de supervivientes con **monosomías parciales**, en donde se pierde solo parte de un cromosoma. Estos casos también se denominan **deleciones segmentales**. Uno de los primeros casos fue publicado por Jerome LeJeune en 1963, cuando describió los síntomas clínicos del **síndrome del *cri-du-chat*** («maullido de gato»). Este síndrome está asociado con la pérdida de una pequeña parte del brazo corto del cromosoma 5 (Figura 8.2). Su constitución genética se puede designar como **46,−5p**, indicando que tal individuo tiene los 46 cromosomas, pero se ha perdido algo o todo el brazo p (el brazo pequeño o corto) de un miembro del cromosoma 5.

Los bebés con este síndrome pueden presentar malformaciones anatómicas, complicaciones gastrointestinales y cardíacas y a menudo retraso mental. El desarrollo anormal de la glotis y de la faringe es característico de este síndrome. Por ello, el bebé tiene un llanto similar al maullido de un gato, dando así el nombre al síndrome.

Desde 1963, se han encontrado en todo el mundo cientos de casos del síndrome *cri-du-chat*. Se ha estimado una incidencia de 1 cada 50.000 nacidos vivos. El tamaño de la deleción del brazo corto varía algo; las deleciones mas largas parece que tienen un impacto mayor en los niveles físicos, psicomotores y mentales de los niños que sobreviven. Aunque los efectos del síndrome son graves, muchos individuos logran un nivel de desarrollo social en el rango educativo. Aquellos que reciben cuidados de su familia y una escolarización especial temprana pueden andar, desarrollan la capacidad de autoprotección y aprenden a comunicarse verbalmente.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo determinamos el contenido de cromosomas en los núcleos somáticos de los individuos?

8.4 La trisomía implica la adición de un cromosoma a un genoma diploide

En general, los efectos de las trisomías ($2n + 1$) van en paralelo a los de las monosomías. Sin embargo, la adición de un cromosoma extra da lugar a individuos algo mas viables que en el caso de la pérdida de un cromosoma, tanto en animales como en vegetales. En animales esto es así a menudo, siempre que el cromosoma implicado sea relativamente pequeño.

Como en las monosomías, la variación de los cromosomas sexuales del tipo trisomía tiene un efecto menos grave en el fenotipo que las variaciones autosómicas. Recuerde de nuestra discusión anterior que las hembras de *Drosophila* con tres cromosomas X y un complemento normal de dos dotaciones autosómicas (3X:2A) sobreviven y se reproducen, pero son menos viables que las hembras normales 2X:2A. En la especie humana, la adición de un cromosoma extra X o Y a una mujer o un varón, que por otra parte tienen una constitución cromosómica normal (47,XXY, 47,XYY y 47,XXX), da lugar a individuos viables que presentan diversos síndromes. Sin embargo, la adición de un autosoma grande a la dotación diploide, tanto



FIGURA 8.2 Cariotipo representativo y fotografía de un niño que presenta el síndrome *cri-du-chat* (46,−5p). En el cariotipo, la flecha indica la ausencia de una pequeña parte del brazo corto de un miembro del par 5 de los cromosomas homólogos.

en *Drosophila* como en las especie humana, tiene graves efectos y normalmente es letal durante el desarrollo.

En los vegetales, los individuos trisómicos son viables, pero su fenotipo puede quedar alterado. Un ejemplo clásico es el del estramonio espinoso *Datura*, una planta conocida hace mucho por sus efectos narcóticos, cuyo número diploide es 24. Son posibles doce tipos diferentes de trisomías primarias, habiéndose recuperado ejemplos de cada una. Cada trisomía altera el fenotipo de la cápsula del fruto lo suficiente como para producir un fenotipo único (Figura 8.3). Al principio se creía que el fenotipo de estas cápsulas estaban ocasionadas por mutaciones en uno o mas genes.

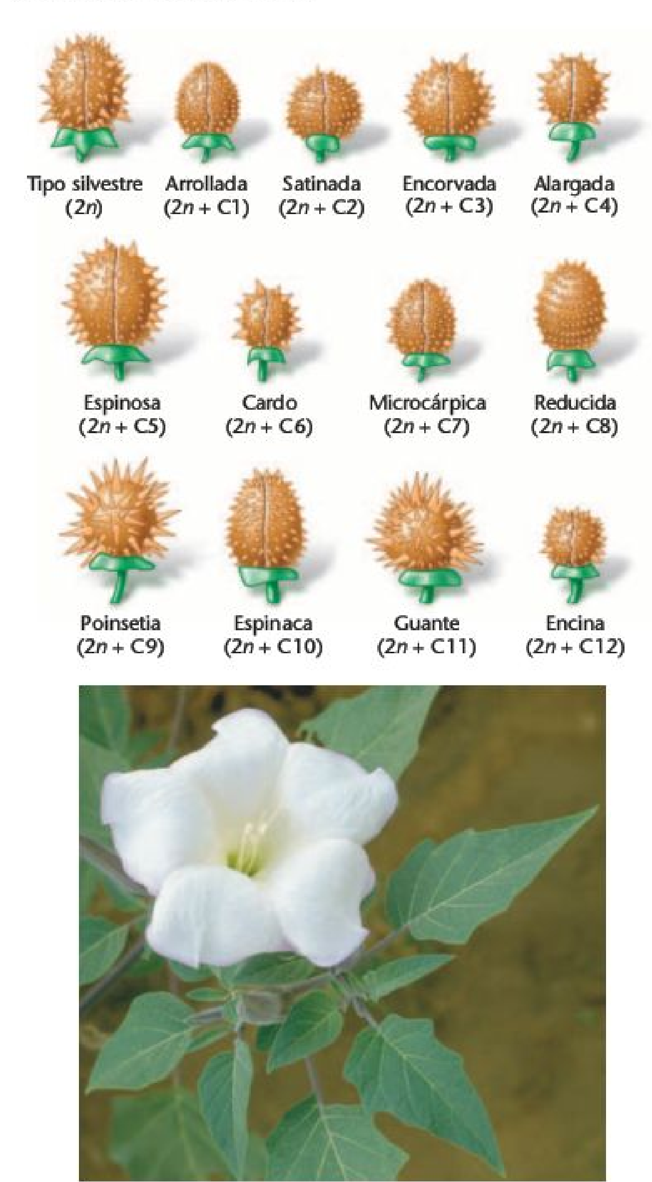


FIGURA 8.3 Esquemas de los fenotipos de la cápsula de los frutos del estramonio espinoso *Datura stramonium*. En comparación con el tipo silvestre, cada fenotipo es el resultado de la trisomía de 1 de los 12 cromosomas característicos del genoma haploide. La fotografía ilustra la misma planta.

Otro ejemplo se observa en el arroz (*Oryza sativa*), que tiene un número haploide de 12. Se han aislado y estudiado cepas trisómicas para cada cromosoma. Las plantas de 11 de las cepas se pueden distinguir entre si y respecto del tipo silvestre. Las trisómicas para los cromosomas más largos son las que mas se diferencian y crecen mas lentamente que el resto. Esto está de acuerdo con la creencia de que los cromosomas más grandes causan un mayor desequilibrio genético que los pequeños. Además, el ritmo de crecimiento, la estructura de la hoja, el follaje, el tallo, la morfología del grano y la altura de la planta varía entre las distintas trisomías.

Tanto en vegetales como en animales, las trisomías se pueden detectar mediante observación citológica de la división meiótica. Ya que hay tres copias de uno de los cromosomas, las configuraciones de apareamiento son normalmente irregulares. En una región dada a lo largo del cromosoma sólo dos de los tres homólogos pueden establecer sinapsis, aunque regiones diferentes del trío pueden estar apareadas. Cuando están en sinapsis tres copias de un cromosoma, la configuración se denomina **trivalente**, que puede situarse en el huso de tal manera que, en la anafase, un miembro se desplace a un polo y los otros dos al opuesto (Figura 8.4). En algunos casos, en lugar de un trivalente se puede encontrar un **bivalente** y un **univalente** (un cromosoma no emparejado) en la primera división meiótica. Así, la meiosis produce gametos con una composición cromosómica de (n + 1), que puede perpetuar la situación trisómica.

El síndrome de Down

La única trisomía autosómica de la especie humana de la que sobrevive un número significativo de individuos más allá del año después del nacimiento fue descubierta por Langdon Down en 1866. Se sabe ahora que el síndrome es consecuencia de la trisomía del cromosoma 21, un cromosoma del grupo G[1] (Figura 8.5), y se llama **síndrome de Down**, o simplemente **trisomía del 21** (designado por **47,+21**). Esta trisomía se encuentra aproximadamente en 1 de cada 800 nacidos vivos.

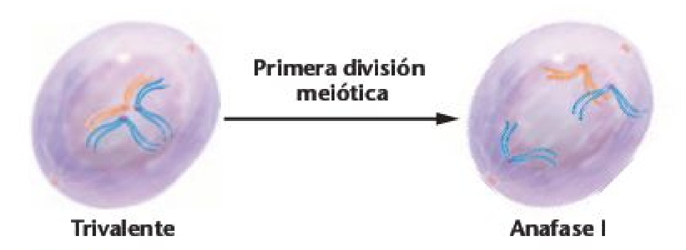


FIGURA 8.4 Representación esquemática de un posible emparejamiento en la meiosis I de tres copias de un cromosoma, formando una configuración trivalente. Durante la anafase I, dos cromosomas se desplazan hacia un polo y el otro cromosoma hacia el polo opuesto.

---

[1] De acuerdo con el tamaño y la situación del centrómero, los autosomas de la especie humana se se clasifican en siete grupos: A(1-3), B(4-5), C(6-12), D(13-15), E(16-18), F(19-20) y G(21-22).





FIGURA 8.5 Cariotipo y una fotografía de un niño con el síndrome de Down. En el cariotipo hay tres miembros del cromosoma 21 del grupo G, dando lugar a la constitución 47,+21.

Típico de otros síndromes, se pueden presentar muchas características fenotípicas, pero cada uno de los individuos afectados expresa sólo una serie de estas. En el caso del síndrome de Down hay de 12 a 14 de tales características, pero cada individuo expresa, como promedio, de 6 a 8 de las mismas. No obstante, la apariencia externa de estos individuos es muy similar, por lo que tienen un notable parecido entre sí. Esto se debe, es su mayor parte, a un pliegue epicántico[2] prominente en la esquina de cada ojo y a una cara típicamente achatada y cabeza redondeada. También son característicamente bajos. También pueden tener lengua saburral y sobresaliente, que da lugar a que la boca permanezca parcialmente abierta; y manos anchas y cortas, con un patrón característico de huellas dactilares y palmares. El desarrollo físico, psicomotor y mental está retrasado y el tono muscular es característicamente bajo. Su esperanza de vida es menor, aunque se conocen casos de supervivencia por encima de los 50 años.

Los niños afectados con el síndrome de Down son propensos a enfermedades respiratorias y a malformaciones cardíacas y presentan una incidencia de leucemia aproximadamente unas 20 veces superior que la de la población normal. Sin embargo, un examen médico cuidadoso y el tratamiento a lo largo de sus vidas ha ampliado su supervivencia de manera significativa. Una observación importante es que la causa de muerte en adultos con el síndrome de Down se debe frecuentemente a la enfermedad de Alzheimer. La aparición de este enfermedad tiene lugar a una edad mas temprana que en las población normales.

[2] El pliegue epicántico es un pliegue epidérmico en la parte superior del párpado, que se extiende desde la nariz a la parte interna de la ceja. Cubre la esquina interior del ojo y parece disminuirlo, proporcionando al ojo una apariencia sesgada. Junto con el síndrome de Down, el epicanto es prominente y un componente normal del ojo en muchos grupos asiáticos.

Se cree que el origen de esta trisomía se debe muy a menudo a una no disyunción del cromosoma 21 en la meiosis. El fallo de la pareja de homólogos a separarse, bien en la anafase I o en la II, puede dar lugar a gametos con $n + 1$ cromosomas. Alrededor del 75 por ciento de estos errores que dan lugar al síndrome de Down se atribuyen a la no disyunción en la meiosis I. Después de la fecundación por un gameto normal, se origina la trisomía.

El análisis cromosómico ha demostrado que, aunque el cromosoma adicional puede provenir del padre o de la madre, el óvulo es el origen de alrededor el 95 por ciento de los casos de trisomía 47,+21. Antes del desarrollo de las técnicas con marcadores polimórficos, que claramente permiten distinguir los homólogos maternos de los paternos, esta conclusión se apoyaba en otras pruebas indirectas derivadas del estudio de la edad de las madres que daban luz a hijos con el síndrome de Down. En la Figura 8.6 se muestra la relación entre la incidencia de nacimientos con el síndrome de Down y la edad materna, ilustrando el enorme incremento cuando aumenta la edad de ésta. Mientras que la frecuencia es de 1 cada 1.000 cuando la edad de la madre es de 30 años, se advierte un aumento de la incidencia de diez veces, hasta una frecuencia de 1 cada 100, a la edad de 40 años. La frecuencia se incrementa todavía más hasta 1 en 50 a la edad de 45 años. Una estadística muy alarmante es que el nacimiento de niños Down se incrementa sustancialmente cuando la edad de la madre excede de los 45 años. A pesar de este probabilidad elevada, debido a que la mayor proporción de embarazos implica a mujeres por debajo de los 35 años, mas de la mitad de los nacimientos con el síndrome de Down se producen en mujeres de esta cohorte más joven.

Aunque parece muy probable que la no disyunción que da lugar al síndrome de Down ocurra durante la oogénesis en mujeres entre los 35 y los 45 años de edad, no sabemos con cer-

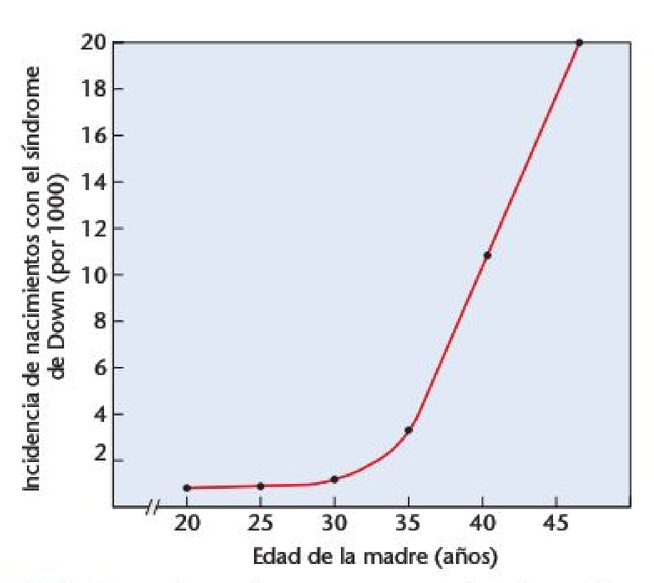


FIGURA 8.6 Incidencia de nacimientos con el síndrome de Down en función de la edad de la madre.

teza porqué es así. Sin embargo, una observación puede ser importante. En las mujeres, las meiosis de todos los óvulos se inician durante el desarrollo fetal. Se ha producido la sinapsis de los homólogos y se ha iniciado la recombinación. Entonces el desarrollo del oocito se detiene en la meiosis I. Por ello, todos los oocitos primarios están formados en el momento del nacimiento. Luego, una vez que comienza la ovulación en la pubertad, la meiosis se reanuda en un óvulo durante cada ciclo ovulatorio y continúa hacia la meiosis II. El proceso se detiene una vez mas después de la ovulación y no se completa hasta que se produce la fecundación.

El resultado final de esta progresión es que cada uno de los sucesivos óvulos ha estado detenido en la meiosis I durante un mes mas que el precedente. En consecuencia, una mujer de 30 a 40 años de edad produce óvulos que son significativamente mas viejos y han estado detenidos mas tiempo que aquellos que se ovulan en los 10 ó 20 años anteriores. Sin embargo, no hay pruebas directas de que la edad del óvulo sea la causa de la mayor incidencia de la no disyunción que da lugar al síndrome de Down.

Estas estadísticas plantean un problema serio para la mujer que queda embarazada tardíamente en su etapa reproductiva. Es muy recomendable el consejo genético temprano en dichos embarazos. Tal consejo informa a los padres responsables acerca de la probabilidad de que sus hijos se vean afectados y les informa acerca del síndrome de Down. Aunque algunos individuos con el síndrome de Down tienen que ser institucionalizados, otros se pueden beneficiar en gran medida de programas de educación especial y se pueden atender en casa. Además, estos niños se distinguen por su naturaleza afectuosa y amable.

Un consejero genético puede recomendar una técnica de diagnóstico prenatal, mediante la cual se aíslan células fetales y se cultivan. La amniocentesis y la muestra de vellosidades coriónicas (CVS) son las dos propuestas más familiares, mediante las que se obtienen células fetales del líquido amniótico o del corion de la placenta, respectivamente. En un planteamiento mas reciente, las células fetales se obtienen directamente de la circulación materna. Una vez perfeccionada, esta técnica será preferible ya que no es invasiva, evitando riesgos al feto. Una vez que se han obtenido las células fetales, se puede determinar el cariotipo del feto mediante análisis citogenético. Si el feto se diagnostica con el síndrome de Down, una opción normalmente disponible para los padres es el aborto terapéutico. Obviamente, esta es una decisión difícil que implica muchos aspectos religiosos y éticos.

Ya que el síndrome de Down está ocasionado por un error aleatorio —la no disyunción del cromosoma 21 en la meiosis materna o paterna— *no* se espera que la incidencia de la anomalía sea hereditaria. No obstante, ocasionalmente, el síndrome de Down se produce en familias. Estos casos, que se denominan **síndrome de Down familiar**, implica una translocación del cromosoma 21, otro tipo de aberración cromosómica, que se discutirá mas adelante en este capítulo.

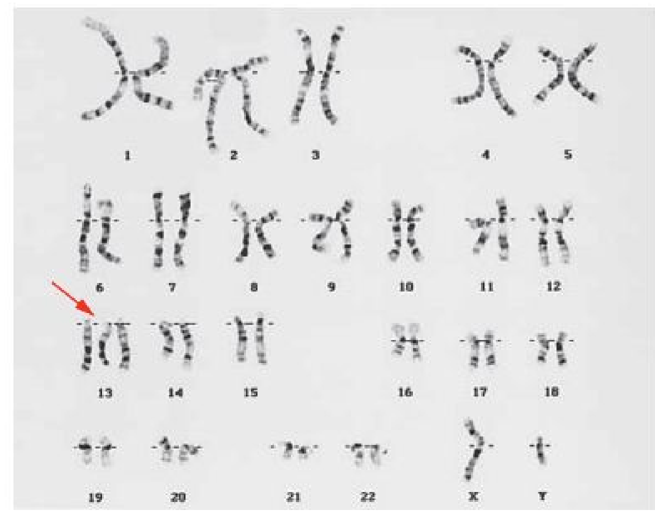
¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que el cromosoma 21 extra presente en los niños con síndrome de Down tiene casi siempre origen materno?

Síndrome de Patau

En 1960, Klaus Patau y sus colaboradores observaron un niño con graves malformaciones del desarrollo y un cariotipo de 47 cromosomas (Figura 8.7). El cromosoma extra tenía un tamaño medio, uno de los acrocéntricos del grupo D, que ahora se denomina cromosoma 13. Desde entonces se ha descrito en muchos recién nacidos la **trisomía del 13**, que se denomina **síndrome de Patau (47,+13)**. Los niños afectados no están mentalmente alerta, se cree que son sordos, tienen una característica fisura labio-palatina y polidactilia. Las autopsias han revelado malformaciones congénitas en muchos sistemas orgánicos, indicativas del desarrollo anormal que se produce a las cinco o seis semanas de gestación. El promedio de supervivencia de estos niños es de unos tres meses.

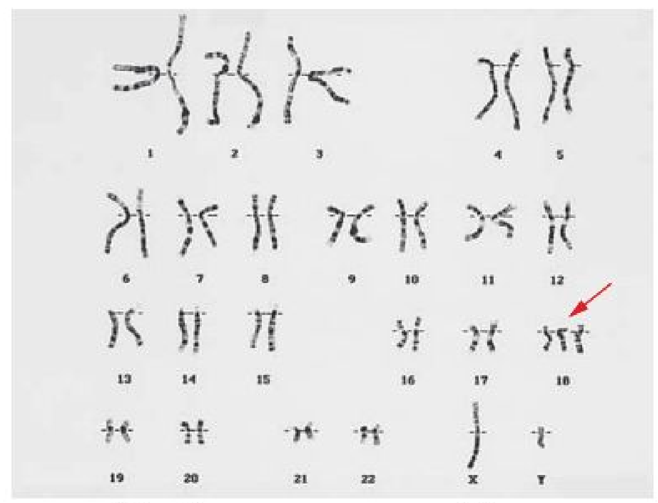
La edad promedio de los padres de niños afectados es mayor que la de los padres de los niños normales, pero no es tan alta como la edad promedio materna en los casos del síndrome de Down. Los dos padres tienen como promedio una edad de 32 años cuando nace el niño afectado. Debido a que este caso es muy raro, pues sólo ocurre en 1 de cada 19.000 nacimientos, no se sabe si el origen del cromosoma extra es más a menudo de origen materno o paterno, o si aparece con igual frecuencia de ambos padres.



Retraso mental
Detención del crecimiento
Orejas deformes, insertadas más abajo
Defecto en el septo atrial
Defecto en el septo ventricular
Granulocitosis polimorfonucleada anormal

Microcefalia
Fisura labio-palatina
Polidactilia
Uñas de los dedos deformes
Quistes renales
Uréter doble
Hernia umbilical
Anormalidades en el desarrollo del útero
Criptorquidia

FIGURA 8.7 Cariotipo y posibles características fenotípicas asociadas con el síndrome de Patau, en donde se encuentran los tres miembros del cromosoma 13 del grupo D, dando lugar a la constitución 47,+13.



Detención del crecimiento
Retraso mental
Suturas craneales abiertas al nacer
Cejas muy arqueadas
Orejas deformes, insertadas más abajo
Esternón pequeño
Defecto en el septo ventricular
Flexiones deformes de los dedos

Riñones anormales
Persistencia del ducto arterioso
Caderas deformes
Genitales externos prominentes
Elevado tono muscular
Talón prominente
Flexión dorsal del dedo gordo del pie

FIGURA 8.8 Cariotipo y posibles características fenotípicas asociadas con el síndrome de Edwards. Hay tres miembros del cromosoma 18 del grupo E, dando lugar a la constitución 47,+18.

Síndrome de Edwards

En 1960, John H. Edwards y sus colegas publicaron el caso de un niño trisómico para un cromosoma del grupo E, que ahora se sabe es el cromosoma 18 (Figura 8.8). Esta aberración de la **trisomía del 18 (47,+18)** también se denomina **síndrome de Edwards** por su descubridor. El fenotipo de estos niños, como el de los individuos con los síndromes de Down y de Patau, ilustra que la presencia de un autosoma extra produce malformaciones congénitas y una menor esperanza de vida. Estos niños son más pequeños de lo normal. Sus cráneos están alargados según el eje antero-posterior y sus orejas son deformes y situadas mas bajo de lo normal. A menudo es característico en tales individuos el cuello ancho, dislocación congénita de la cadera y mentón deprimido. Aunque la frecuencia de la trisomía del 18 es algo mayor que la trisomía del 13, el promedio de supervivencia es aproximadamente el mismo, menos de cuatro meses. La muerte se produce normalmente por neumonía o fallo cardíaco.

De nuevo, la edad media materna es alta —según un cálculo de 34,7 años. En contraste con el síndrome de Patau, los bebés con el síndrome de Edwards son preponderantemente mujeres. En una serie de observaciones sobre 143 casos, el 80 por cientos eran mujeres. En conjunto, alrededor de 1 cada 8000 nacidos vivos presentan esta dolencia.

Viabilidad de las aneuploidías en la especie humana

La viabilidad reducida de los individuos detectados con monosomías y trisomías, sugieren que podrían aparecer muchas otras aneuploidías, pero los fetos afectados no llegan a término. Esta observación se ha confirmado por los análisis cariotípicos de fetos de abortos espontáneos. En una amplia revisión de este tema realizada en 1971 por David H. Carr se demostró que un porcentaje significativo de abortos son trisómicos para uno u otro de los autosomas. Se recuperaron trisomías para cada uno de los cromosomas humanos. Sin embargo, raramente se encontraron monosomías en el estudio de Carr, aun cuando la no disyunción debería producir gametos $n - 1$ y gametos $n + 1$ con igual frecuencia. Este hecho sugiere que los gametos que carecen de un cromosoma son tan anormales funcionalmente que nunca participan en la fecundación o que los embriones monosómicos mueren tan tempranamente que su recuperación es muy poco frecuente. En el estudio de Carr también se encontraron varias formas de poliploidía y otras anomalías cromosómicas.

Ciertos estudios, incluido el trabajo de Carr, revelaban algunos datos estadísticos notables. En la especie humana se estimó que entre el 15 y el 20 por ciento de todas las concepciones terminan con abortos espontáneos y que alrededor del 30 por ciento de los abortos demuestran alguna forma de anomalía cromosómica. Un cálculo usando estos números ($0{,}2 \times 0{,}3 = 0{,}06$) predice que hasta un 6 por ciento de todos los embarazos se inician con un número anormal de cromosomas. Muchos de estos terminan antes del nacimiento. Recientemente se han encontrado valores más dramáticos. Se estima ahora que entre el 10 y el 30 por ciento de todos los óvulos fecundados tienen algún error en el número de cromosomas.

El mayor porcentaje de anomalías cromosómicas son aneuploidías. Sorprendentemente, una aneuploidía con una de las incidencias mas altas entre los abortos es la situación 45,X, que da lugar a niñas con el síndrome de Turner si el feto sobrevive a término. Entre el 70 y el 80 por ciento de los abortos y de los nacidos vivos con el síndrome de Turner 45,X llevan el cromosoma X materno. Es decir, el error meiótico que da lugar a este síndrome se produce en la espermatogénesis.

En conjunto, estas observaciones apoyan la hipótesis de que el desarrollo embrionario normal requiere una dotación exacta de cromosomas, que mantienen un delicado equilibrio de la expresión de la información genética. La mortalidad prenatal de la mayoría de las aneuploidías es una barrera contra la introducción en las poblaciones humanas de una serie de anomalías genéticas basadas en los cromosomas.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que en la especie humana la aneuploidía para cada uno de los 22 autosomas se produce en la concepción, aun cuando muy a menudo las aneuploidías humanas no sobreviven al desarrollo embrionario o fetal y por ello nunca se observan al nacer?

8.5 La poliploidía, en la que se encuentran más de dos dotaciones haploides de cromosomas, es predominante en los vegetales

Seminario Web 8.2 Poliploidía

El término *poliploidía* describe los casos en donde se encuentran múltiplos de más de dos dotaciones haploides de cromosomas. La denominación de los poliploides se basa en el número de dotaciones que se encuentran: Un **triploide** tiene $3n$ cromosomas; un **tetraploide** $4n$; un **pentaploide** $5n$ y así sucesivamente. Se pueden hacer varias afirmaciones generales sobre la poliploidía. Esta situación es relativamente rara en muchas especies animales, pero está bien documentada en lagartijas, anfibios y peces. Es mucho mas común en vegetales. Números impares de dotaciones cromosómicas no se mantienen normalmente de manera segura de generación en generación ya que un organismo poliploide con un número impar de homólogos no produce normalmente gametos genéticamente equilibrados. Por ello, los triploides, pentaploides y similares no se encuentran normalmente en especies que dependan exclusivamente de la reproducción sexual para su propagación.

La poliploidía se puede originar de dos modos: (1) La adición de una o mas dotaciones extras de cromosomas, idénticas a la dotación haploide normal de la misma especie, da lugar a **autopoliploidía**; y (2) como consecuencia de cruces interespecíficos puede darse la combinación de dotaciones cromosómicas de especies diferentes, dando lugar a la **alopoliploidía** (del griego, *allo*, que significa otro o diferente). La distinción entre auto- y alopoliploidía se basa en el origen genético de las dotaciones cromosómicas extra, como se indica en la Figura 8.9.

En nuestra discusión sobre la poliploidía, utilizaremos ciertos símbolos para clarificar el origen de las dotaciones cromosómicas adicionales. Por ejemplo, si A representa la dotación haploide de cromosomas de cualquier organismo, entonces

$$A = a_1 + a_2 + a_3 + a_4 + \cdots + a_n$$

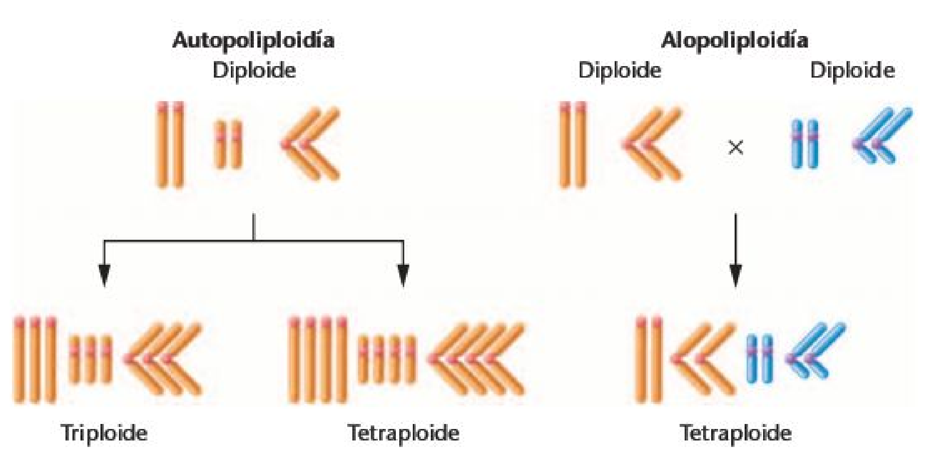


FIGURA 8.9 Comparación del origen de los cromosomas de un cariotipo autopoliploide y de un alopoliploide.

en donde a_1, a_2, etc., representan cromosomas y en donde n es el número haploide. Utilizando esta nomenclatura, un organismo diploide normal quedaría representado simplemente por *AA*.

Autopoliploidía

En la autopoliploidía, cada dotación adicional de cromosomas es idéntica a la de la especie paterna. Por ello, los triploides se representan como *AAA*, los tetraploides como *AAAA* y así sucesivamente.

Los **autotriploides** aparecen de varias maneras. Un fallo en la segregación de todos los cromosomas en las divisiones meióticas (no disyunción en la primera o segunda división) puede dar lugar a un gameto diploide. Si tal gameto sobrevive y es fecundado por un gameto haploide, se produce un zigoto con tres dotaciones de cromosomas, u ocasionalmente, dos espermatozoides pueden fecundar a un óvulo resultando un zigoto triploide. También se pueden producir triploides en condiciones experimentales cruzando diploides con tetraploides. Los organismo diploides producen gametos con n cromosomas, mientras que los tetraploides producen gametos $2n$, Después de la fecundación se produce el deseado triploide.

Debido a que tienen un número par de cromosomas, teóricamente es mas probable encontrar en la naturaleza **autotetraploides** ($4n$) que autotriploides. A diferencia de los triploides, que a menudo producen gametos genéticamente desequilibrados con número impar de cromosomas, los tetraploides tienen mayor probabilidad de producir gametos equilibrados cuando se reproducen sexualmente.

Tiene un gran interés saber cómo surge la poliploidía de manera natural. En teoría, si los cromosomas se han replicado, pero la célula madre no se divide y vuelve a entrar en interfase, se doblará el número de cromosomas. Que esto es probablemente lo que ocurre viene apoyado por la observación de que se pueden producir experimentalmente células tetraploides a partir de células diploides, aplicando un choque térmico, caliente o frío, a células en meiosis, o aplicando **colchicina** a células somáticas en mitosis. La colchicina es un alcaloide derivado del azafrán de otoño, que interfiere en la formación del huso, y así, los cromosomas replicados que no pueden separarse en la anafase, no migran a los polos. Cuando se elimina la colchicina, las células pueden volver a entrar en interfase. Cuando las cromátidas hermanas se separan y se desespiralizan, el núcleo tendrá doble número de cromosomas que la situación diploide, es decir, $4n$. Este proceso se ilustra en la Figura 8.10.

En general, los autotetraploides son más grandes que sus parientes diploides. Tal incremento parece que se debe a un aumento en el tamaño celular, más que a un aumento del número de células. Aunque los autopoliploides no tienen informaciones nuevas o únicas comparados con sus parientes diploides, las flores y los frutos de estas plantas aumentan a menudo de tamaño, haciendo que tales variedades tengan un gran valor agrícola y comercial. Entre las plantas triploides económicamente importantes se encuentran varias especies de patatas del genero *Solanum*, manzanas «Winesap», bananas comerciales, sandías sin semilla y la azucena atigrada cultivada *Lilium tigrinum*. Estas plantas se propagan asexualmente. Las bananas diploides tienen semilla duras, pero la variedad comercial triploide «sin semillas», tiene semillas comestibles. Variedades tetraploides de alfalfa, café, cacahuetes y manzanas «McIntosh» tienen también valor económico porque son mas grandes o crecen mas vigorosamente que sus parientes diploides o triploides. La variedad comercial de la fresa es octoploide.

Hace mucho que sentimos curiosidad por cómo las células con valores de ploidía aumentados, en donde no hay nuevos genes, expresan fenotipos diferentes que sus contrapartidas diploide. Nuestra capacidad actual para examinar la expresión génica utilizando la biotecnología ha proporcionado algunas ideas interesantes. Por ejemplo, Gerald Fink y sus colegas han podido obtener cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con una, dos tres o cuatro copias del genoma. Así, cada cepa tiene genes idénticos (se dice son isogénicas) pero valores de ploidía diferentes. Luego examinaron los niveles de expresión de todos los genes a lo largo del ciclo biológico del organismo. Utilizando patrones mas bien estrictos de un incremento o dismi-

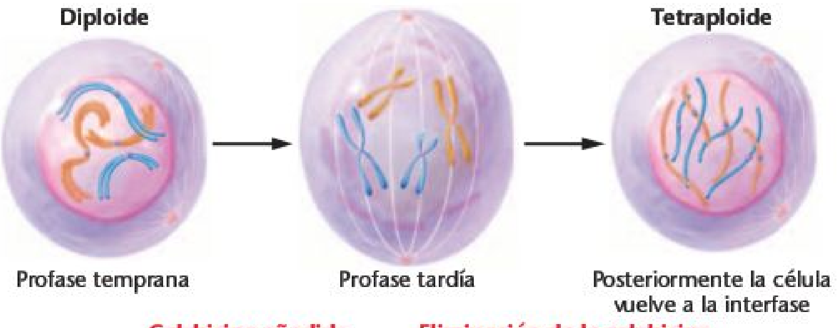


FIGURA 8.10 Implicación potencial de la colchicina en la duplicación del número de los cromosomas, tal como se da en la producción de un autotretraploide. Se siguen dos pares de cromosomas homólogos. Aunque cada cromosoma ha replicado su DNA tempranamente en interfase, los cromosomas no aparecen como estructuras dobles hasta el final de la profase. Cuando no se produce anafase, el número de cromosomas se dobla si la célula vuelve a la interfase.

nución en diez veces la expresión génica, Fink y sus colegas identificaron diez casos en donde, a medida que aumenta la ploidía, la expresión génica aumentaba al menos diez veces y siete casos en donde se redujo de manera similar.

Uno de estos genes proporcionó ideas de cómo las células poliploides son mas grandes que sus contrapartidas haploides o diploides. En la levadura poliploide, dos **ciclinas G1**, la C1n1 y la Pc11, son reprimidas a medida que la ploidía aumenta, mientras que el tamaño de las células de levadura aumenta. Esto se explica basándonos en la observación de que las ciclinas G1 facilitan el paso de la célula a través de G1, que se hace más lento cuando la expresión de estos genes se reprime. La célula permanece en G1 más tiempo y, en promedio, crece a un tamaño mayor cuando va más allá del estadio G1 del ciclo celular. Las células de levadura también presentan morfología diferente con el aumento de la ploidía. Algunos otros genes, reprimidos cuando aumenta la ploidía, tienen que ver con la dinámica del citoesqueleto, que explica los cambios morfológicos.

Alopoliploidía

La poliploidía también se puede originar por hibridación de dos especies íntimamente relacionadas. Si un óvulo haploide de una especie con dotación cromosómica AA es fecundado por un espermatozoide haploide de una especie con dotación cromosómica BB, resultará un híbrido AB, en donde $A = a_1, a_2, a_3,...a_n$ y $B = b_1, b_2, b_3,...b_n$. La planta híbrida puede ser estéril debido a su incapacidad para producir gametos viables. Esto ocurre muy a menudo cuando alguno o todos los cromosomas *a* y *b* no son homólogos y por consiguiente no pueden aparearse en la meiosis. En consecuencia se produce una situación genéticamente desequilibrada. Sin embargo, si la nueva combinación genética *AB* sufre una duplicación de los cromosomas, natural o inducida, habrá dos copias de todos los cromosomas *a* y de todos los cromosomas *b* y podrán formar parejas en la meiosis. En consecuencia se producirá un tetraploide fértil AABB. Este proceso se ilustra en la Figura 8.11. Ya que este poliploide tiene el equivalente de cuatro genomas haploides derivados de dos especies distintas, tal organismo se denomina **alotetraploide**. En tales casos, cuando se conocen las dos especies originales, se prefiere el término equivalente **anfidiploide** para describir al alotetraploide.

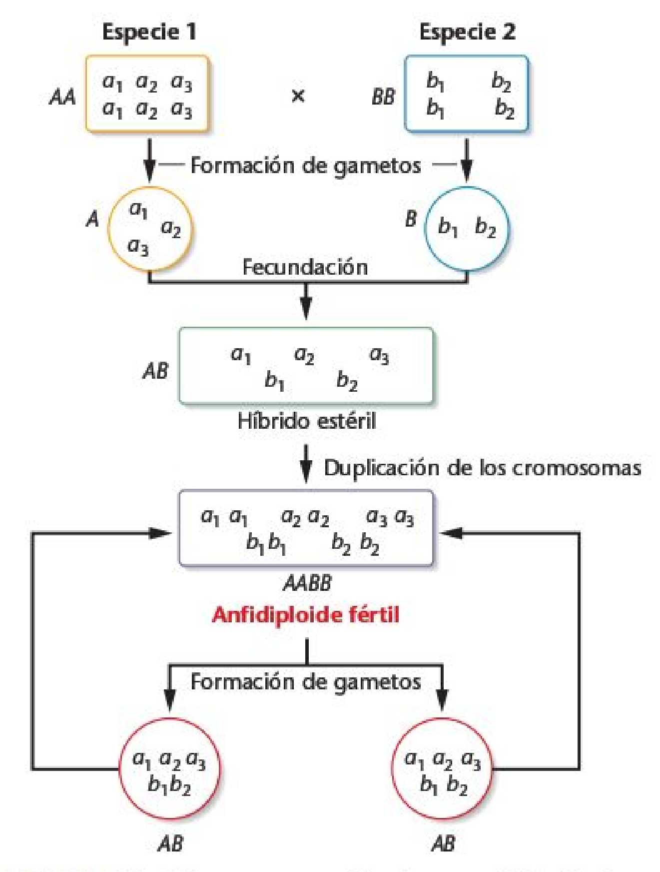


FIGURA 8.11 Origen y propagación de un anfidiploide. La especie 1 tiene el genoma *A*, con tres cromosomas, a_1, a_2 y a_3. La especie 2 tiene el genoma *B*, con dos cromosomas, b_1 y b_2. Después de la fecundación entre miembros de las dos especies y de la duplicación de los cromosomas, se forma un anfidiploide fértil, que tiene dos genomas diploides completos.

En la naturaleza se encuentran a menudo anfidiploides. Su éxito reproductivo se basa en su potencial para formar gametos equilibrados. Ya que hay dos homólogos de cada cromosoma, la meiosis puede proceder normalmente (Figura 8.11) y la fecundación puede propagar sexualmente a la planta con éxito. Esta discusión supone la situación más simple, en donde ninguno de los cromosomas del grupo *A* son homólogos de los del grupo *B*. En anfidiploides formados por especies mas íntimamente relacionadas, sin duda existirá algo de homología entre los cromosomas *a* y *b*. En este caso, el apareamiento en la meiosis es más complejo. Al establecer la sinapsis, se formarán multivalentes, lo que dará lugar a la producción de gametos desequilibrados. En tales casos pueden surgir variedades aneuploides a partir de anfidiploides. Los alopoliploides son raros en la mayoría de los animales debido a que el comportamiento en el apareamiento es muy a menudo específico para la especie; así, es improbable que ocurra el paso inicial en la hibridación.

Un ejemplo clásico de anfidiploide en vegetales es la especie cultivada de algodón americano, *Gossypium* (Figura 8.12). Esta especie tiene 26 pares de cromosomas: 13 son grandes y otros 13 mas pequeños. Cuando se descubrió que el algodón del Viejo Mundo tenía sólo 13 pares de cromosomas grandes, se sospecho la alopoliploidía. Cuando se examinó el algodón silvestre americano y se vio que tenía 13 pares de cromosomas pequeños, esta sospecha se reforzó. J. O. Beasley pudo reconstruir el origen del algodón cultivado de modo experimental. Cruzó la variedad del Viejo Mundo con la variedad silvestre americana y luego trató al híbrido con colchicina, para doblar el número de cromosomas. El resultado de este tratamiento fue una variedad de algodón anfidiploide fértil. Tenía 26 parejas de cromosomas y características similares a la variedad cultivada.



FIGURA 8.12 Cápsulas de una forma anfidiploide de *Gossypium*, la planta de algodón cultivada.

A menudo, los anfidiploides presentan caracteres de ambas especies paternas. Un ejemplo interesante, pero sin aplicaciones económicas prácticas, es el híbrido formado entre el rábano *Raphanus sativus* y la col *Brassica oleracea*. Ambas especies tienen un número haploide de 9. El híbrido inicial consta de 9 cromosomas de *Raphanus* y 9 de *Brassica* (9R + 9B). Aunque los híbridos casi siempre son estériles, se produjeron algunos anfidiploides fértiles (18R + 18B). Desgraciadamente, la raíz de esta planta es más parecida a la de la col y su parte aérea mas parecida a la del rábano. Si hubiera ocurrido lo contrario, el híbrido podría haber tenido importancia económica.

Una hibridación comercial que ha tenido mucho mas éxito se ha realizado utilizando dos gramíneas, el trigo y el centeno. El trigo (género *Triticum*) tiene un genoma haploide básico de 7 cromosomas. El centeno (género *Secale*) tiene también un genoma con 7 cromosomas. Además de los diploides normales ($2n = 14$), existen especies de trigo cultivado alopoliploides, como tetraploides ($4n = 28$) y hexaploides ($6n = 42$). La única especie cultivada de centeno es la planta diploide ($2n = 14$).

Utilizando la técnica descrita en la Figura 8.11, los genéticos han producido varios híbridos alopoliploides. Cuando se cruza trigo tetraploide con centeno diploide y se trata a la F_1 con colchicina, se obtiene una variedad hexaploide ($6n = 42$). El híbrido, denominado *Triticale*, representa un nuevo género. Las variedades híbridas fértiles derivadas de varias especies de trigo y centeno se pueden cruzar o retrocruzar. Estos cruces han dado lugar a muchas variedades del género *Triticale*. Por ejemplo, se ha producido una variedad octoploide útil (alooctoploide) con 56 cromosomas a partir de centeno diploide y trigo hexaploide.

Las plantas híbridas presentan características tanto del trigo como del centeno. Por ejemplo, ciertos híbridos combinan el alto contenido proteico del trigo con el alto contenido del aminoácido lisina del centeno. El contenido en lisina del trigo es bajo y por ello tiene un valor nutritivo limitado. El trigo se considera una gramínea de alta producción, mientras que el centeno es notable por su versatilidad de crecimiento en ambientes desfavorables. Las especies de *Triticale*, que combinan ambas características, tienen el potencial de un aumento en la producción de grano significativo. Los programas diseñados para mejorar las cosechas mediante hibridación, se están realizando hace tiempo en varios países en vías de desarrollo de todo el mundo, tal como se discutió en el Capítulo 1.

Recuerde que en un capítulo anterior discutimos la utilización de la **hibridación celular somática** para cartografiar genes de la especie humana. (Véase el Capítulo 6.) Esta técnica se ha utilizado también para la producción de plantas anfidiploides (Figura 8.13). Se pueden tratar células de las hojas en desarrollo de plantas para eliminar su pared celular, dando lugar a **protoplastos**. Estas células modificadas se pueden mantener en cultivo y estimularlas para que se fusionen con otros protoplastos, dando lugar a células híbridas somáticas. Si se fusionan de este modo células de especies vegetales diferentes, se pueden producir células híbridas anfidiploides. Debido a que a los protoplastos se les puede inducir a que se dividan y diferencien tallos que den lugar a hojas, se dispone del potencial para producir alopoliploides en los laboratorios de investigación. En algunos casos, a partir de un cultivo de protoplastos se pueden obtener plantas completas. Si sólo se producen tallos y hojas, se pueden injertar en el tallo de otra planta. Si se forman flores, la fecundación puede dar lugar a semillas maduras que al germinar darán lugar a una planta alopoliploide.

En la actualidad hay muchos ejemplos de alopoliploides que se han obtenido comercialmente utilizando los métodos anteriores. Aunque la mayor parte no son auténticos anfidiploides (se pierden uno o mas cromosomas), a veces se producen alotetraploides completos.

Ahora resuelva esto

En el Problema 8.7 de la página 240 se le pide que considere una planta híbrida, derivada de dos especies distintas, que es mas vistosa que sus padres, pero estéril.

Sugerencia: Las plantas alopoliploides son a menudo estériles cuando tiene un número impar de cada cromosoma, dando lugar en la meiosis a gametos desequilibrados.

Endopoliploidía

La endopoliploidía es una situación en la que sólo ciertas células de un organismo diploide son poliploides. En tales células, la replicación y separación de los cromosomas se produce sin división nuclear. En la naturaleza se han observado numerosos ejemplos de endopoliploides. Por ejemplo, los núcleos de las células hepáticas de los vertebrados, incluida la especie humana, tienen a menudo dotaciones cromosómicas $4n$, $8n$ ó $16n$. El tallo y tejido parenquimático de las regiones apicales de las fanerógamas también presentan a menudo endopoliploidía. Las

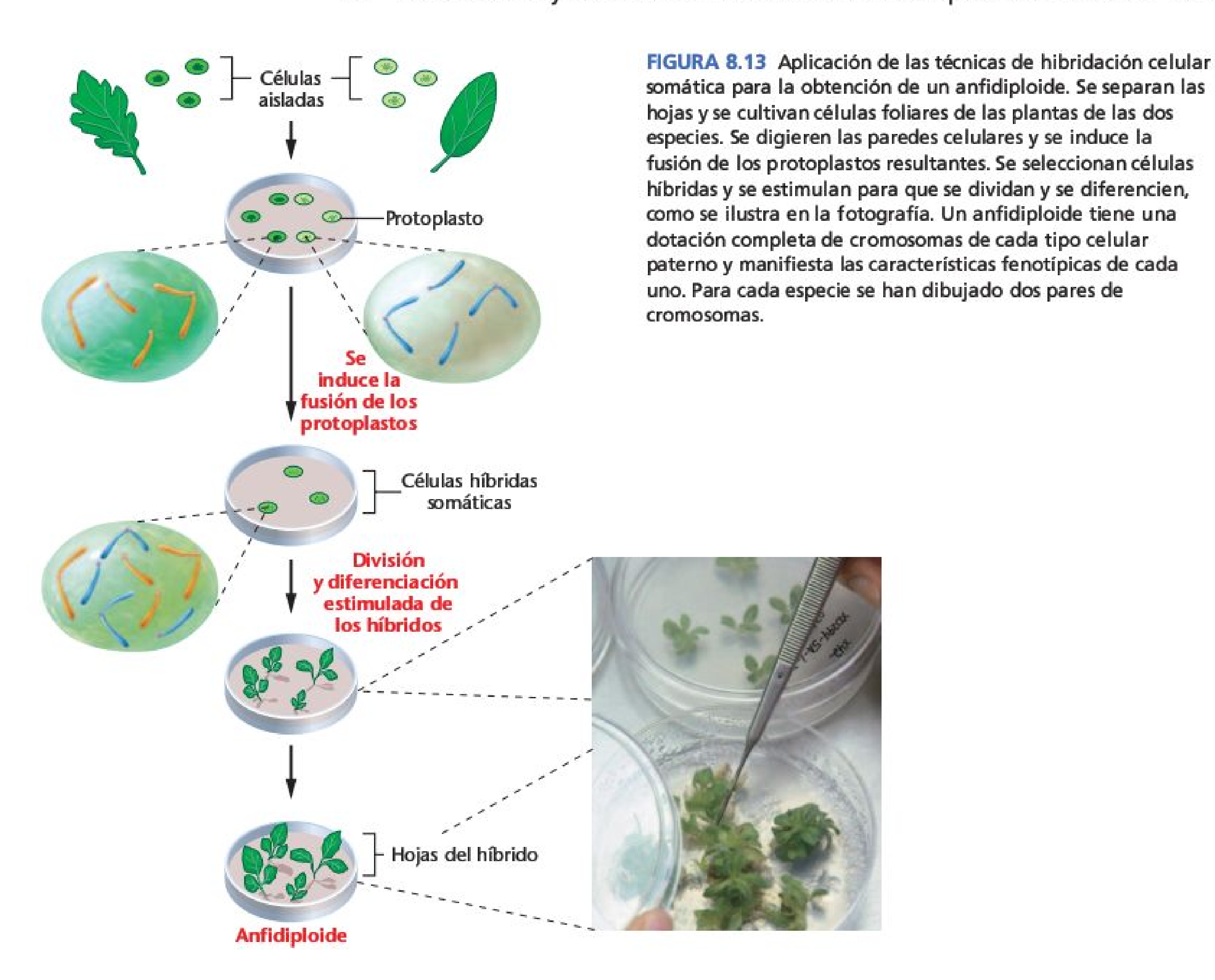


FIGURA 8.13 Aplicación de las técnicas de hibridación celular somática para la obtención de un anfidiploide. Se separan las hojas y se cultivan células foliares de las plantas de las dos especies. Se digieren las paredes celulares y se induce la fusión de los protoplastos resultantes. Se seleccionan células híbridas y se estimulan para que se dividan y se diferencien, como se ilustra en la fotografía. Un anfidiploide tiene una dotación completa de cromosomas de cada tipo celular paterno y manifiesta las características fenotípicas de cada uno. Para cada especie se han dibujado dos pares de cromosomas.

células que tapizan el intestino de las larvas de mosquitos alcanza una ploidía de 16*n*, pero durante los estadios pupales tales células sufren divisiones reduccionales muy rápidas, dando lugar a células diploides mas pequeñas. En el zapatero *Gerris*, se encuentra una gran variedad de números cromosómicos en tejidos diferentes, llegándose hasta 1.024 ó 2.048 copias de cada cromosoma en las células de las glándulas salivares. Ya que el número diploide de este organismo es de 22, los núcleos de estas células pueden llegar a tener por encima de los 40.000 cromosomas.

Aunque el papel de la endopoliploidía no está claro, la proliferación de copias de cromosomas ocurre a menudo en células en donde se necesita una elevada producción de ciertos productos génicos. De hecho, se ha demostrado claramente que ciertos genes, cuyos productos son necesarios en mucha cantidad en *cada* célula, se encuentran de forma natural en el genoma en copias múltiples. Los genes ribosómicos y del RNA de transferencia son ejemplos de genes con copias múltiples. En ciertas células de organismos, en donde incluso esta situación puede no permitir una cantidad suficiente de un producto génico dado, puede ser necesario replicar todo el genoma, permitiendo una tasa de expresión mucho mayor de dicho gen.

8.6 En la estructura y en la ordenación de los cromosomas se producen variaciones

El segundo tipo de aberraciones cromosómicas incluye cambios estructurales que eliminan, añaden o reordenan partes sustanciales de uno o más cromosomas. En esta amplia categoría se encuentran las deleciones y las duplicaciones de genes o de parte de un cromosoma y las reordenaciones del material genético mediante las que segmentos de un cromosoma se invierten, se intercambian con un segmento de un cromosoma no homólogo o simplemente se transfieren a otro cromosoma. Los intercambios y las transferencias se denominan *translocaciones*, en las que la localización de un gen está cambiada dentro del genoma. En la Figura 8.14 se ilustran estos tipos de alteraciones cromosómicas.

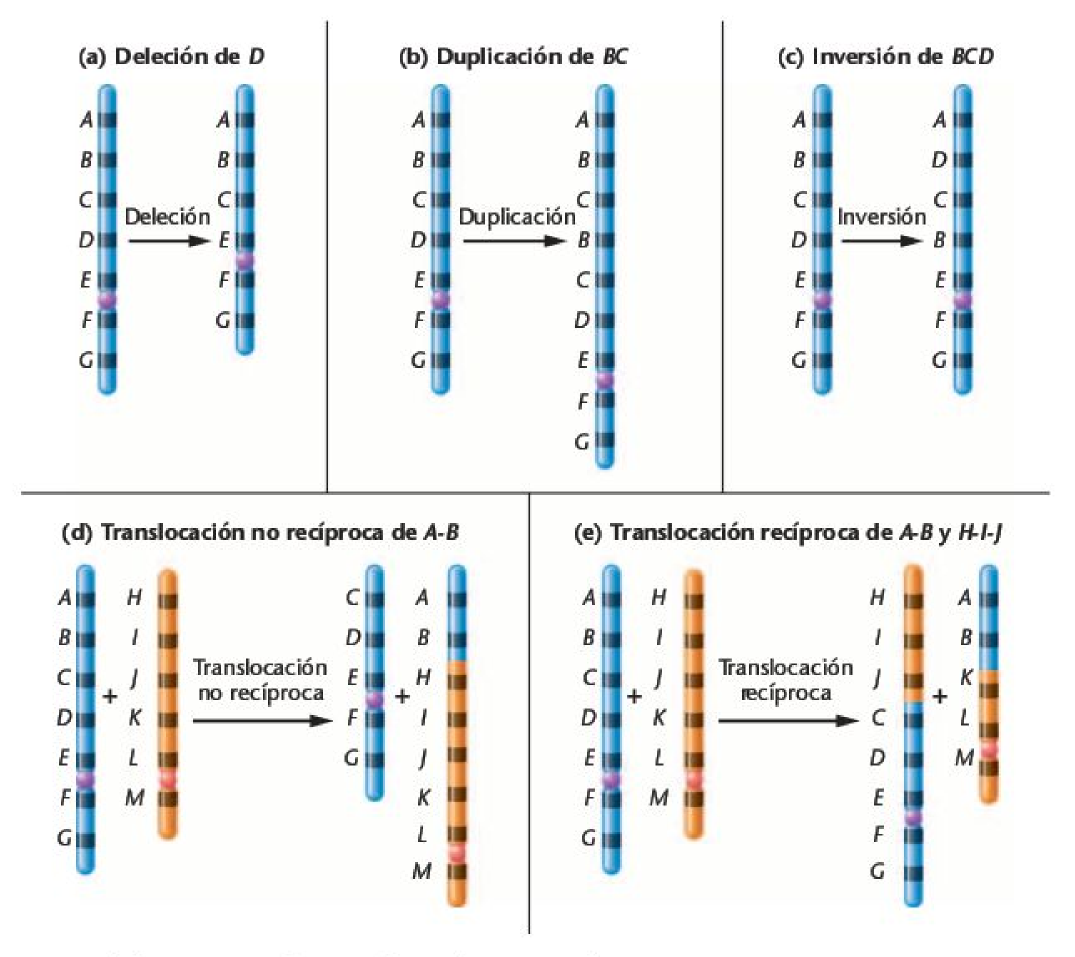


FIGURA 8.14 Revisión de los siete tipos distintos de reordenaciones de segmentos cromosómicos.

En muchos casos, estos cambios estructurales se deben a una o mas roturas distribuidas a lo largo del cromosoma, seguidas por la pérdida o la reordenación del material genético. Los cromosomas pueden romperse espontáneamente, pero la tasa de roturas puede aumentar en células expuestas a sustancias químicas o a radiación. Aunque los extremos normales de los cromosomas, los telómeros, no se fusionan fácilmente con extremos nuevos de cromosomas rotos o con otros telómeros, los extremos producidos en los puntos de rotura son «pegajosos» y pueden reunirse con otros extremos rotos. Si la rotura y reunión no restablece las relaciones originales y si la alteración se produce en el plasma germinal, los gametos tendrán una reordenación estructural que será heredable.

Si la aberración se encuentra en un homólogo, pero no en el otro, se dice que los individuos son heterozigotos para la aberración. En tales casos se producen configuraciones raras, pero características, en el apareamiento durante la sinapsis meiótica. Estos patrones son útiles para identificar el tipo de cambio que ha ocurrido. Si no hay pérdida o ganancia de material genético, los individuos que llevan la aberración en heterozigosis en uno de los dos homólogos (descritos como heterozigotos para la aberración) probablemente no quedarán afectados en su fenotipo. Sin embargo, los complicados apareamientos de las ordenaciones dan lugar a menudo a gametos con duplicaciones o deficiencias de algunas regiones cromosómicas. Cuando esto ocurre, los descendientes de «portadores» de ciertas aberraciones tienen a menudo una mayor probabilidad de presentar cambios fenotípicos.

8.7 Una deleción es la pérdida de una región de un cromosoma

Cuando un cromosoma se rompe en uno o más sitios y se pierde una parte del mismo, el trozo perdido se denomina **deleción** (o **deficiencia**). La deleción puede ocurrir cerca de un extremo o en la parte interna del cromosoma. Éstas se denominan **deleciones terminales** o **intersticiales**, respectivamente [Figura 8.15(a) y (b)]. La parte del cromosoma que conserva la región centrómerica normalmente se mantendrá cuando la célula se divida, mientras que el segmento sin centrómero se perderá finalmente en las células hijas después de la mitosis o meiosis. Cuando hay sinapsis entre un cromosoma con una deficiencia intersticial grande y un homólogo normal com-

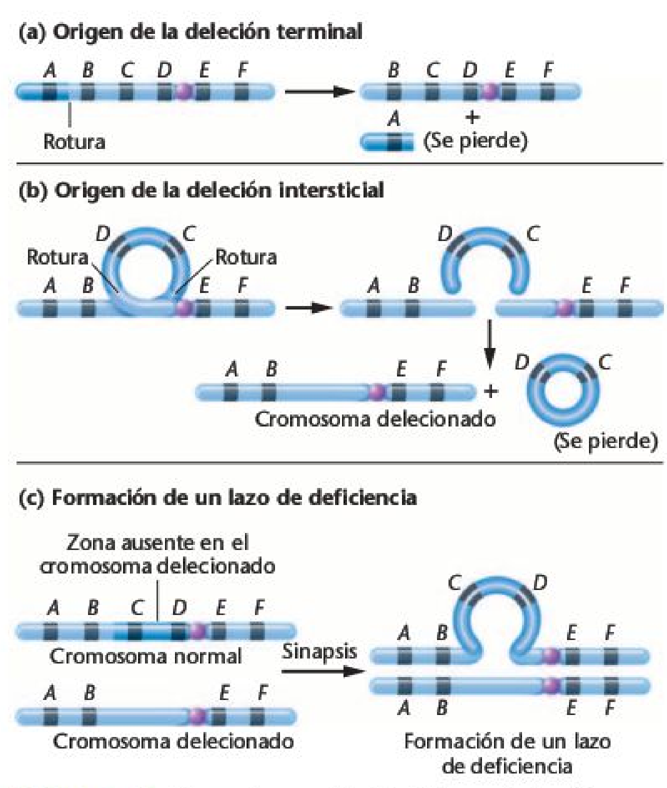


FIGURA 8.15 Origen de una deleción (a) terminal y (b) intersticial. En la parte (c), hay apareamiento entre un cromosoma normal y otro con una deleción intersticial, con la formación de un bucle de la región no delecionada dando lugar a un lazo de deficiencia (o de compensación).

pleto, la región no apareada del homólogo normal forma un bucle que se denomina **lazo de deleción** o de **compensación** [Figura 8.15(c)].

Como vimos al principio de nuestra discusión sobre el síndrome *cri-du-chat*, en donde se pierde sólo una pequeña parte del brazo corto del cromosoma 5, la deleción de una parte de un cromosoma no necesita ser muy grande para que los efectos sean graves. Si se pierde incluso mas información genética como consecuencia de una deleción, la aberración es a menudo letal. Tales mutaciones cromosómicas nunca están disponibles para su estudio. Advierta que cuando una deleción implica una parte notable de un cromosoma, como en el síndrome *cri-du-chat*, podemos también denominar la situación resultante como monosomía parcial.

Podemos advertir por último una consecuencia de las deleciones en organismos heterozigotos para una deficiencia. Consideremos el fenotipo mutante *Notch* de *Drosophila*. En estas moscas, las alas presentan muescas en los márgenes posteriores y laterales. Los datos obtenidos de cruces indican que el fenotipo está controlado por una mutación dominante ligada al X, ya que las hembras heterozigotas tienen alas melladas y transmiten dicho alelo a la mitad de sus hijas. También parece que la mutación se comporte como letal en homozigosis y en hemizigosis, ya que nunca se recuperan las hembras y los machos correspondientes. También se ha visto que si las hembras con alas mutantes son además heterozigotas para las mutaciones recesivas ojo *white*, ojo *facet* o quetas *split*, íntimamente ligadas, expresan estos fenotipos mutantes además del fenotipo *Notch*. Debido a que estas mutaciones son recesivas, los heterozigotos deberían expresar los fenotipos normales. En la Tabla 8.2 se resumen estos genotipos y fenotipos.

TABLA 8.2 GENOTIPOS Y FENOTIPOS *NOTCH*

Genotipos	Fenotipo
$\frac{N^{+}}{N}$	Hembra *Notch*
$\frac{N}{N}$	Letal
$\frac{N}{=}$	Letal
$\frac{N^{+}w}{N(w^{+})*}$	Hembra *Notch, white*
$\frac{N^{+}fa\ spl}{N(fa^{+}spl^{+})*}$	Hembra *Notch, facet, split*

*(delecionado)

Estas observaciones se han explicado mediante el examen citológico de los cromosomas especialmente grandes que caracterizan ciertas células de las larvas de muchos insectos. Llamados **cromosomas politénicos** (véase el Capítulo 12), presentan un patrón de bandas específico para cada región de cada cromosoma. En tales células de hembras heterozigotas *Notch*, se encontró un bucle de deficiencia en el cromosoma X, desde la banda 3C2 hasta la banda 3C11, como se muestra en la Figura 8.16. Anteriormente se había demostrado que en estas bandas se localizaban, entre otros, los loci *white*, *facet* y *split*. La deficiencia de esta región en uno de los cromosomas X

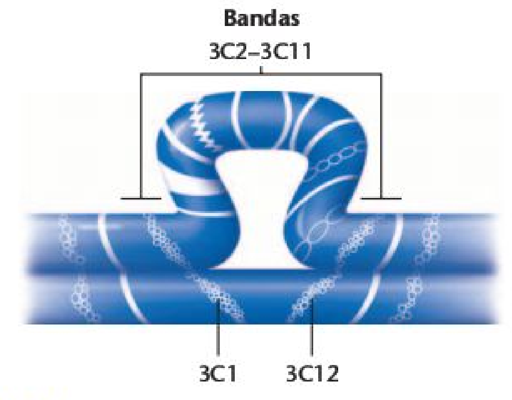


FIGURA 8.16 Bucle de deficiencia formado en un cromosoma politénico de las glándulas salivares de *Drosophila melanogaster*, cuando la mosca es heterozigota para una deleción. La deleción abarca de la banda 3C2 hasta la 3C11, que corresponde a la región asociada al fenotipo *Notch*.

homólogos tiene dos efectos distintos. Primero, da lugar al fenotipo *Notch*. Segundo, al delecionarse los loci de los genes cuyos alelos mutantes están presentes en el otro cromosoma X, la deficiencia da lugar a una hemizigosis parcial, de tal manera que se expresan los alelos recesivos *white*, *facet* y *split*. Este tipo de expresión fenotípica de genes recesivos en relación con una deleción, es un ejemplo del fenómeno denominado **pseudodominancia**.

Se han investigado muchos fenotipos *Notch* aparecidos independientemente. La banda deficiente común para todos los fenotipos *Notch* es la 3C7. En los casos en que *white* también se expresa de manera pseudodominante, falta también la banda 3C2. De esta manera se han confirmado las bandas que distinguen citológicamente al locus *Notch* del locus *white*.

8.8 Una duplicación es la repetición de un segmento de material genético

Cuando se encuentra cualquier parte del material genético —un locus o un fragmento grande de un cromosoma— más de una vez en el genoma, nos referimos a ella como una **duplicación**. Como en las deleciones, el apareamiento en heterozigosis puede dar lugar a un bucle. Las duplicaciones pueden surgir como consecuencia de un **entrecruzamiento desigual** entre cromosomas en sinapsis en la meiosis (Figura 8.17) o por un error en la replicación antes de la meiosis. En el primer caso se producen tanto duplicaciones como deficiencias.

Consideraremos tres aspectos interesantes de las duplicaciones. Primero, pueden dar lugar a redundancia génica. Segundo, al igual que las deleciones, las duplicaciones pueden dar lugar a variaciones en el fenotipo. Tercero, de acuerdo con una teoría muy aceptada, las duplicaciones han sido también una fuente importante de variabilidad genética en la evolución.

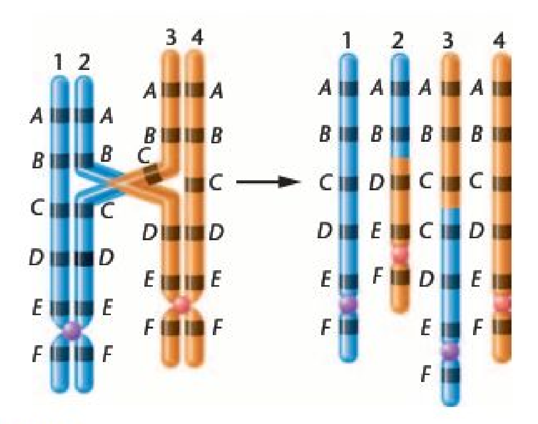


FIGURA 8.17 Origen de regiones cromosómicas duplicadas y deficientes, como consecuencia de entrecruzamiento desigual. La tétrada de la izquierda se empareja erróneamente en la sinapsis. Un entrecruzamiento entre las cromátidas 2 y 3 da lugar a regiones cromosómicas deficientes y duplicadas. (Véanse los cromosomas 2 y 3, respectivamente, de la derecha.) Los dos cromosomas no implicados en el entrecruzamiento quedan normales en cuanto al contenido y secuencia de genes.

Redundancia y amplificación génica: genes del RNA ribosómico

Aunque muchos productos génicos no son necesarios en cada una de las células del organismo, se sabe que otros productos génicos son esenciales para todas las células. Por ejemplo, el RNA ribosómico tiene que estar presente en abundancia para una síntesis proteica normal. Cuanto más activa sea la célula metabólicamente, más necesidad tendrá de esta molécula, la cual entra a formar parte de todos los ribosomas. En teoría, una sola copia del gen que codifica para el rRNA puede ser inadecuada en muchas células. Estudios con técnicas de hibridación molecular, que permiten determinar el porcentaje del genoma que codifica para secuencias específicas de RNA, demuestran que nuestra hipótesis es correcta. Realmente, es la norma para los organismos tener copias múltiples de los genes que codifican al rRNA. En conjunto, tal DNA se denomina **rDNA** y el fenómeno se denomina *redundancia génica*. Por ejemplo, en la bacteria intestinal *Escherichia coli* (*E. coli*) alrededor del 0,4 por ciento del genoma haploide es rDNA. Esto equivale de 5 a 10 copias del gen. En *Drosophila melanogaster*, el 0,3 por ciento del genoma haploide es rDNA, lo que equivale a 130 copias. Aunque la presencia de copias múltiples del mismo gen no está restringida a aquellos que codifican el rRNA, en esta sección sólo nos fijaremos en ellas.

Estudios en *Drosophila* han demostrado la enorme importancia de grandes cantidades de rRNA y ribosomas que resultan de las copias múltiples de estos genes. En *Drosophila*, se ha demostrado que la mutación *bobbed* ligada al X se debe a la deleción de un número variable de los 130 genes que codifican al rRNA. Cuando el número de estos genes se reduce y se produce insuficiente cantidad de rRNA, el resultado son moscas mutantes que tienen baja viabilidad, desarrollo incompleto y quetas de tamaño reducido. Tanto el desarrollo en general, como la formación de las quetas, que se producen muy rápidamente en fase de pupa durante el desarrollo normal, dependen aparentemente de un gran número de ribosomas para llevar a cabo la síntesis proteica. Se han estudiado muchos alelos *bobbed* y se ha demostrado que todos ellos tienen una deleción, a menudo de un tamaño específico. La reducción, tanto de la viabilidad como de la longitud de las quetas, está muy bien correlacionada con el número relativo de genes de rRNA delecionados. Podemos concluir que la redundancia normal del rDNA observada en *Drosophila* de tipo silvestre está próxima al mínimo necesario para la adecuada producción de ribosomas durante el desarrollo normal.

En algunas células, especialmente en oocitos, incluso la redundancia normal del rDNA puede ser insuficiente para proporcionar cantidades adecuadas de rRNA y ribosomas. Los oocitos almacenan en el ooplasma muchos nutrientes para el uso

del embrión durante las primeras etapas del desarrollo. De hecho, en los oocitos se acumula una cantidad de ribosomas mayor que en cualquier otro tipo celular. Considerando como el anfibio *Xenopus laevis* (el sapo con garras de África del Sur) adquiere esta abundancia de ribosomas, veremos otra manera de aumentar la cantidad de rRNA. Este fenómeno se denomina **amplificación génica**.

Los genes que codifican el rRNA están localizados en una región cromosómica denominada **región organizadora nucleolar (NOR)**. La NOR está íntimamente asociada con el nucleolo, que es un centro de procesado para la producción de ribosomas. Los análisis de hibridación molecular han demostrado que cada NOR de *Xenopus* tiene el equivalente a 400 copias génicas redundantes que codifican rRNA. Incluso este número de genes es aparentemente inadecuado para sintetizar la enorme cantidad de ribosomas que se tienen que acumular en el oocito de los anfibios para sostener el desarrollo después de la fecundación. Para amplificar aun mas el número de genes de rRNA, se replica de manera selectiva el rDNA y cada nuevo grupo de genes se separa de su molde. Debido a que cada nueva copia es equivalente a una NOR, alrededor de cada NOR del oocito se forman múltiples y pequeños nucleolos. Se han observado hasta 1.500 de estos «micronucleolos» en un solo oocito. Si multiplicamos el número de micronucleolos (1.500) por el número de copias génicas en cada NOR (400), vemos que la amplificación en los oocitos de *Xenopus* puede dar lugar a mas de medio millón de copias génicas. Si cada copia se transcribe solo 20 veces durante la maduración de un solo oocito, en teoría se producirá suficiente número de copias de rRNA para dar lugar a mas de un millón de ribosomas.

La mutación ojo *Bar* en *Drosophila*

Las duplicaciones pueden dar lugar a cambios en el fenotipo, que a primera vista podría parecer que están ocasionados por una mutación génica. El fenotipo ojo *Bar* (*B*) (Figura 8.18) de *Drosophila* es un ejemplo clásico. En lugar del ojo normal de forma oval, las moscas *Bar* tienen ojos estrechos, como barras. Este fenotipo parece que se hereda como mutación dominante ligada al X. Sin embargo, debido a que tanto hembras heterozigotas como machos hemizigotos manifiestan el carácter, aunque las hembras homozigotas presentan un fenotipo mas pronunciado que cualquiera de los otros dos casos, el tipo de herencia ilustra muy exactamente el fenómeno de la **semidominancia**.

Hacia principios de la década de 1920, Alfred H. Sturtevant y Thomas Morgan descubrieron e investigaron esta aparente mutación. Como se ilustra en la Figura 8.18(a), las hembras normales (B^+/B^+) tienen unas 800 facetas en cada ojo. Las hembras heterozigotas (B^+/B) tienen unas 350 facetas, mientras que las hembras homozigotas (B/B) solo tienen, como promedio, unas 70 facetas. Ocasionalmente se recuperan hembras con un número incluso menor de facetas, que se designan como *doble Bar* (B^D/B^+).

Unos 10 años mas tarde, Calvin Bridges y Herman J. Muller compararon el patrón de bandas de cromosomas X politénicos de moscas *Bar* y de moscas normales. Recuerde de nuestra discusión sobre las deleciones que tales cromosomas tienen patrones de bandas específicos que caracterizan regiones concretas del cromosoma. (Véase la Figura 8.16.) Los estudios de Bridges y Muller revelaron que en las moscas de tipo silvestre había una copia de la región 16A en el cromosoma X y que esta región estaba duplicada en las moscas *Bar* y triplicada en las *doble Bar*. Estas observaciones proporcionaron la prueba de que el fenotipo Bar no es el resultado de un simple cambio químico en un gen, sino de una duplicación. Las moscas *doble Bar* se originan como consecuencia de un entrecruzamiento desigual, que da lugar a la región 16A triplicada [Figura 8.18(b)].

La Figura 8.18 también ilustra lo que se denomina **efecto de posición**. Podemos recordar de la introducción de este término en el Capítulo 4 que un efecto de posición se refiere a una expresión génica alterada como consecuencia de una nueva localización de un gen en el genoma. En este caso, cuando se compara el número de facetas del ojo en moscas B/B y B^D/B^+, se encuentra un promedio de 68 y 45 facetas respectivamente. En ambos casos, hay dos regiones 16A extras. Sin embargo, cuando los segmentos repetidos se encuentran en el mismo homólogo en lugar de estar situados en los dos homólogos, el fenotipo es más pronunciado. Así, la misma cantidad de información genética produce dos fenotipos distintos, dependiendo de la posición de los genes.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que la mutación ojo Bar de Drosophila se debe a una región génica duplicada mas que al cambio en la secuencia nucleotídica de un gen?

El papel de las duplicaciones génicas en la evolución

Uno de los aspectos intrigantes del estudio de la evolución es especular sobre los mecanismos posibles de la variación genética. El origen de productos génicos singulares presentes en organismos filogenéticamente avanzados, que no se encuentran en las formas ancestrales menos avanzadas, es un tema de interés particular. En otras palabras, ¿cómo aparecen los genes «nuevos»?

En 1970, Susumo Ohno publicó el polémico libro *Evolution by Gene Duplication*, en el que discutía sobre la importancia de la duplicación génica en el origen de nuevos genes en la evolución. Aunque no fue el primero en sugerir que las duplicaciones podrían proporcionar un «reservorio» a partir del cual pudieran surgir nuevos genes, Ohno proporcionó una explicación detallada de esta idea. La tesis de Ohno se basaba en la suposición de que los productos de genes esenciales, presentes como copias únicas en el genoma, son indispensables para la supervivencia de los miembros de cualquier especie a

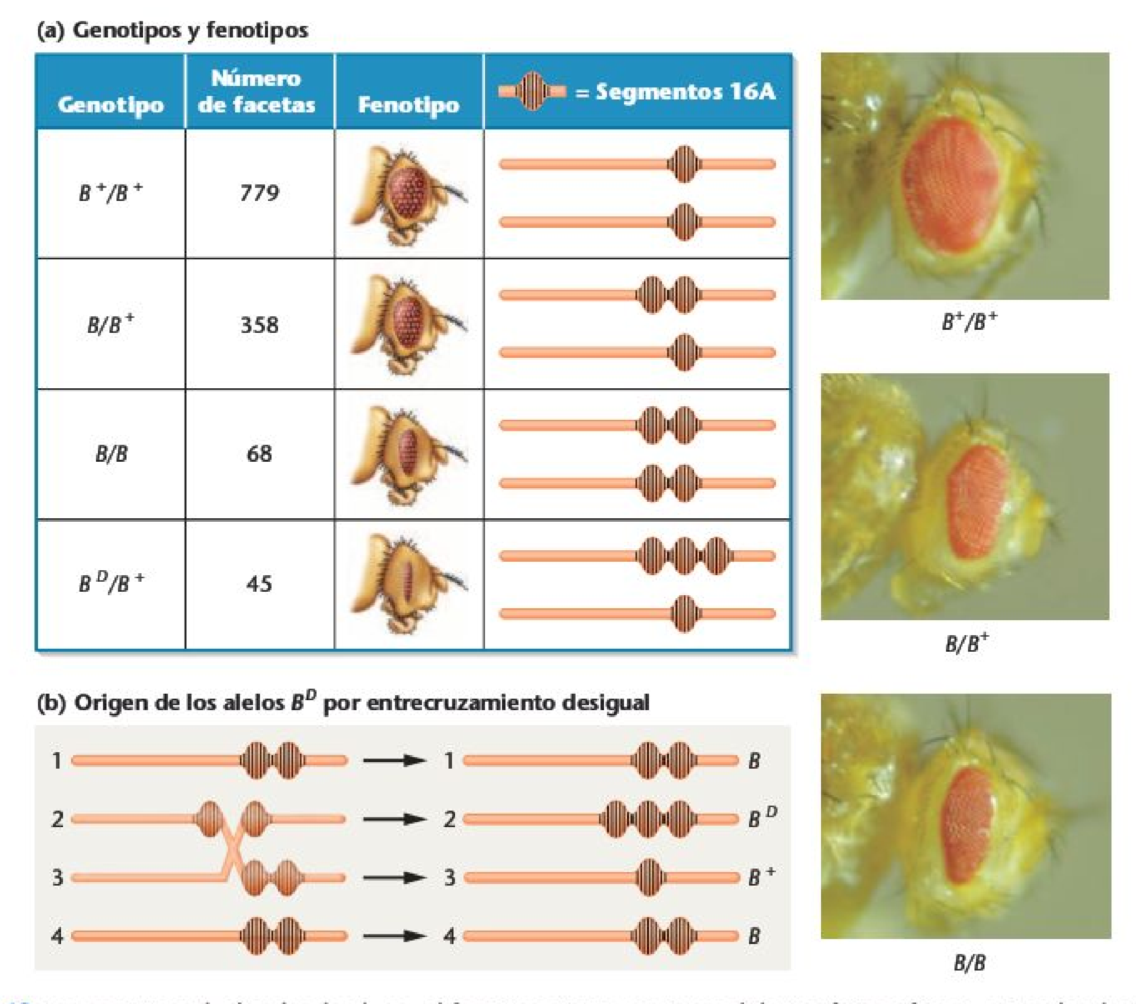


FIGURA 8.18 Los genotipos duplicados dan lugar al fenotipo ojo *Bar* en *Drosophila*. Las fotografías muestran los dos fenotipos de ojos *Bar* y el de tipo silvestre (B^1/B^1). (b) Origen del alelo B^D (doble *Bar*).

lo largo de la evolución. Por consiguiente, estos genes no pueden acumular mutaciones que alteren su función primaria y dar lugar potencialmente a nuevos genes.

Sin embargo, si se duplicara un gen esencial en una línea germinal, en la copia extra se tolerarían cambios mutacionales importantes en generaciones futuras, ya que el gen original proporciona la información genética para su función esencial. La copia duplicada quedaría libre para adquirir muchos cambios mutacionales durante largos periodos de tiempo. En periodos cortos, la nueva información genética podría no tener ventajas prácticas. Sin embargo, en periodos evolutivos largos, el gen duplicado podría cambiar lo suficiente como para que su producto asumiera un papel divergente en la célula. La nueva función podría dar una ventaja «adaptativa» al organismo, incrementando su eficacia biológica. Ohno ha imaginado un mecanismo mediante el cual pudo haberse originado sustancial variabilidad genética.

La tesis de Ohno está apoyada por el descubrimiento de genes que tienen una parte importante de sus secuencias de DNA en común, pero cuyos productos génicos son distintos. Por ejemplo, en los vertebrados las enzimas digestivas tripsina y quimiotripsina encajan en esta descripción, al igual que las proteínas respiratorias mioglobina y hemoglobina. En estos casos, la homología en la secuencia del DNA es lo suficientemente grande como para concluir que los miembros de cada par surgieron de un gen ancestral común mediante duplicación. En la evolución, los genes relacionados divergieron lo suficiente como para que sus productos se convirtieran en únicos.

Otros apoyos son la presencia de **familias génicas**, grupos regionales de genes, cuyos productos realizan la misma función general. De nuevo, miembros de una familia presentan la suficiente homología en su secuencia de DNA como para concluir que comparten un origen común. Los distintos tipos de cadenas de la globina, que forman parte de la hemoglobina, son un ejemplo. Aunque las distintas cadenas de globina funcionan en momentos diferentes durante el desarrollo, todas ellas forman parte de la hemoglobina, cuya función es transportar oxígeno. Otros ejemplos son los receptores de las células T, importantes inmunológicamente, y los antígenos codifi-

cados por el complejo principal de histoincompatibilidad (MHC).

Muchos hallazgos recientes, basados en nuestra habilidad para secuenciar genomas completos, han continuado apoyando la idea de que la duplicación génica sido un rasgo común de la progresión evolutiva. Por ejemplo, Jurg Spring comparó un gran número de genes de *Drosophila* con sus homólogos en la especie humana. En 50 de los genes estudiados, en la mosca de la fruta hay una copia, mientras que en el genoma humano hay múltiples copias. Hay muchas otras investigaciones que han proporcionado datos similares. Por ejemplo, de los aproximadamente 5.000 genes de la levadura hay 55 regiones duplicadas con 376 pares de genes duplicados. En la mostaza *Arabidopsis thaliana*, aproximadamente el 70 por ciento del genoma está duplicado. En la especie humana hay 1.077 bloques de genes duplicados, con 781 de ellos con cinco o más copias. Los cromosomas 18 y 20 tienen grandes áreas duplicadas que explican casi la mitad de cada cromosoma.

En relación con un segundo aspecto de la tesis de Ohno —que en los mayores saltos evolutivos, como la transición de invertebrados a vertebrados, pudieron estar implicada la duplicación de genomas completos— se está produciendo en la actualidad un interesante debate. Ohno sugirió que esto podría haber ocurrido varias veces durante el curso de la evolución. Mientras que parece claro que se han duplicado genes e incluso segmentos de cromosomas, todavía no hay ninguna evidencia precisa para convencer a los biólogos evolutivos de que éste fue claramente el caso. Sin embargo, desde el punto de vista de la expresión génica, duplicar todos los genes proporcionalmente parece más probable que sea tolerado que duplicar sólo una parte de ellos. Cualquiera que sea el caso, es interesante examinar pruebas basadas en tecnologías nuevas para comprobar una hipótesis que se propuso hace más de 30 años, mucho antes de que se dispusieran de dichas tecnologías.

8.9 Las inversiones reordenan la secuencia lineal de los genes

La **inversión**, otra clase de variación estructural, es un tipo de aberración cromosómica en la que un segmento de un cromosoma está girado 180º sobre si mismo.

Una inversión no implica pérdida de información genética sino simplemente una reordenación lineal de la secuencia de genes. Una inversión requiere dos roturas y la posterior reinserción del segmento invertido. La Figura 8.19 ilustra cómo puede originarse una inversión. Formando un lazo cromosómico antes de la rotura, los nuevos extremos «pegajosos» creados se aproximan y se reúnen. El segmento invertido puede ser corto o muy largo y puede incluir o no al centrómero. Si el centrómero *está* incluido en el segmento invertido (cómo en la Figura 8.19), entonces la inversión se denomina **pericéntrica**.

Si el centrómero *no* forma parte del segmento cromosómico reordenado, la inversión se denomina **paracéntrica**. Aunque en la inversión paracéntrica la secuencia de genes se ha invertido, la proporción de las longitudes de los brazos a partir del centrómero no cambia (Figura 8.20). Por el contrario, algunas inversiones pericéntricas dan lugar a cromosomas con brazos de longitudes diferentes respecto del cromosoma sin inversión, cambiando por ello la proporción de los brazos. El cambio en la longitud de los brazos se puede detectar a veces en la metafase de las divisiones mitóticas y meióticas.

Aunque puede parecer que las inversiones tienen un impacto mínimo sobre los individuos que las llevan, sus consecuencias son de gran interés para los genéticos. Los organismos heterozigotos para inversiones pueden dar lugar a gametos aberrantes con un impacto importante en su descendencia. Las inversiones también pueden dar lugar a efectos de posición y jugar un papel importante en el proceso evolutivo.

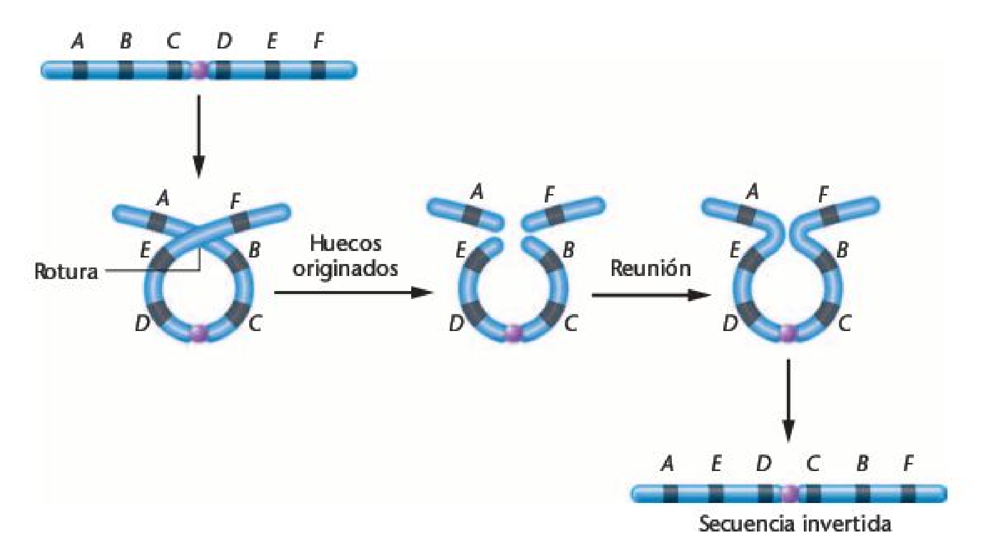


FIGURA 8.19 Un posible origen de una inversión pericéntrica.

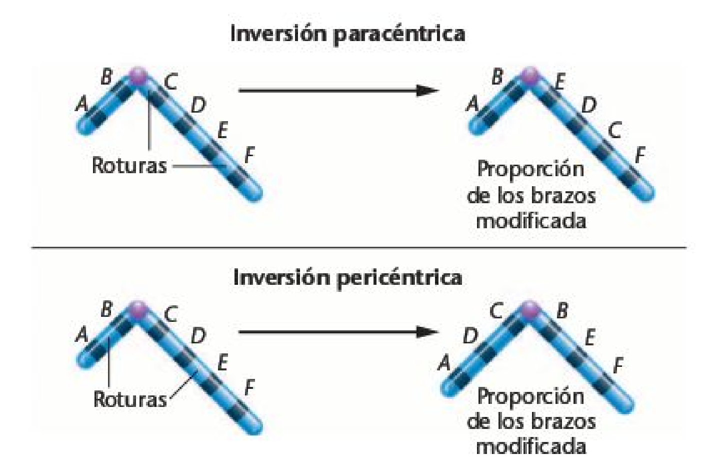


FIGURA 8.20 Comparación de la proporción de los brazos de un cromosoma submetacéntrico antes y después de la formación de una inversión paracéntrica y pericéntrica. Sólo la inversión pericéntrica puede dar lugar a una alteración de la proporción original.

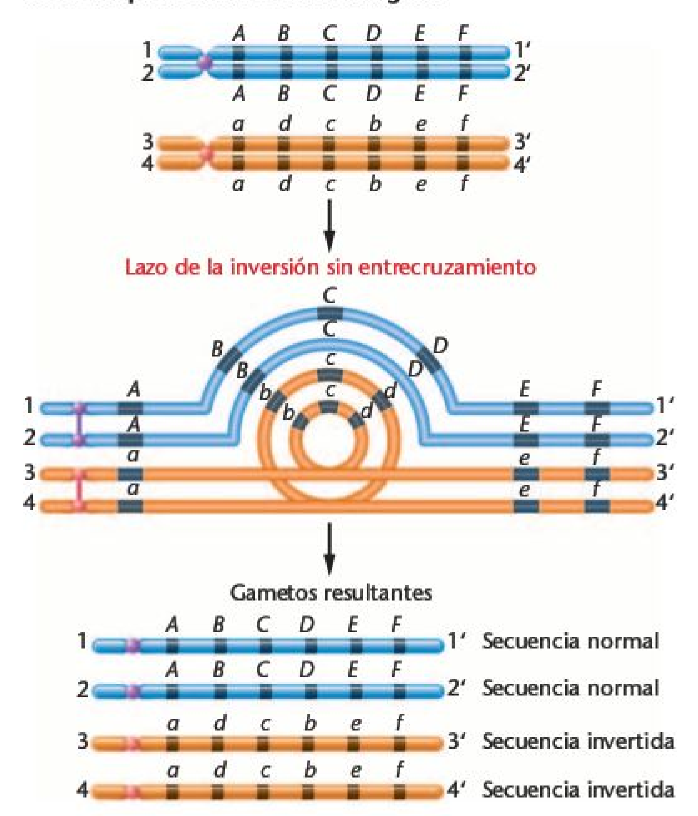


FIGURA 8.21 Ilustración de cómo se produce la sinapsis en una inversión pericéntrica heterozigota en virtud de la formación de un lazo de inversión.

Consecuencias de las inversiones en la formación de los gametos

Si solo uno de los miembros de un par de cromosomas homólogos tiene un segmento invertido, en la meiosis no es posible una sinapsis lineal normal. Los individuos con un cromosoma invertido y con el homólogo no invertido se denominan **heterozigotos para una inversión**. El apareamiento en la meiosis entre tales cromosomas puede realizarse sólo si se forma un **lazo de inversión** (Figura 8.21). En otros casos, si no se forma el lazo, los homólogos se observan en sinapsis pero no en la zona de la inversión, en donde permanecen separados.

Si en el heterozigoto para la inversión no hay entrecruzamiento dentro del segmento invertido, los homólogos segregarán y darán lugar a dos cromátidas normales y dos invertidas, que se distribuirán en los gametos y la inversión pasará a la mitad de los descendientes. Sin embargo, si hay entrecruzamiento dentro del lazo de inversión, se producirán cromátidas anormales. Por ejemplo, el efecto de un solo intercambio dentro de una inversión paracéntrica se esquematiza en la Figura 8.22(a). Como en cualquier tétrada en la meiosis, un entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas produce dos cromátidas paternas y dos cromátidas recombinantes. Como se muestra, una cromátida recombinante es **dicéntrica** (con dos centrómeros) y la otra es **acéntrica** (carece de centrómero). Ambas tienen también duplicaciones y deleciones de segmentos de cromosomas. En la anafase, una cromátida acéntrica se mueve aleatoriamente hacia uno u otro polo, o puede perderse, mientras que una cromátida dicéntrica es atraída hacia los dos polos. Este movimiento polarizado da lugar a un **puente dicéntrico**[3], que se puede observar citológicamente. Una cromátida dicéntrica normalmente se romperá en algún punto, por lo que en la división reduccional parte de la cromátida ira a un gameto y parte a otro gameto. Por consiguiente, los gametos tendrán cualquiera de las dos cromátidas rotas, que tienen deficiencias de material genético.

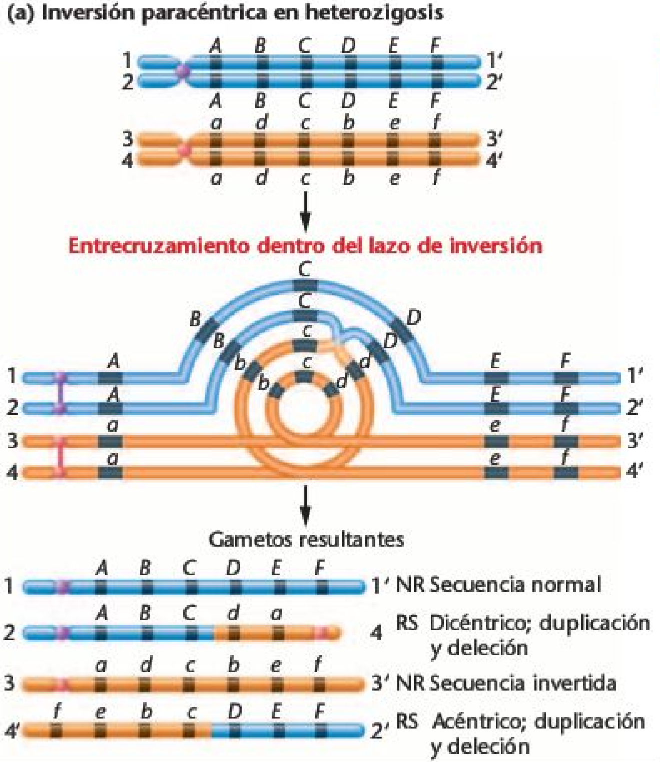
Como consecuencia de un entrecruzamiento entre una cromátida con una inversión pericéntrica y su homóloga no invertida, se produce un desequilibrio cromosómico similar, como se ilustra en la Figura 8.22(b). Las cromátidas recombinantes directamente implicadas en el intercambio tienen duplicaciones y deleciones. Sin embargo, no se producen cromátidas acéntricas o dicéntricas.

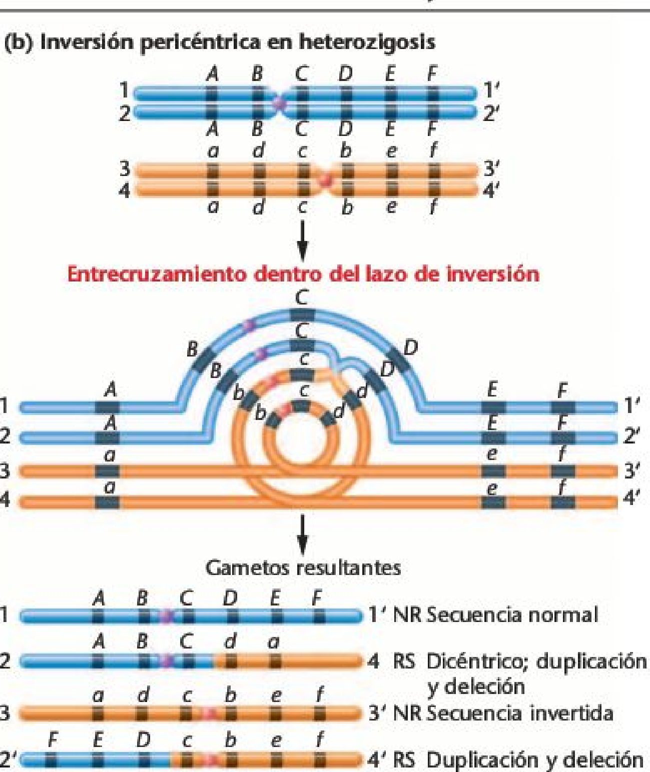
En los vegetales, los gametos que reciben tales cromátidas aberrantes normalmente no se desarrollan bien, dando lugar a polen u óvulos abortados. Así, antes de la fecundación se produce letalidad y semillas inviables. En los animales, los gametos se han desarrollado antes del error en la meiosis, por lo que la fecundación es más probable que se dé a pesar del error cromosómico. Sin embargo, el resultado final después de la fecundación es la producción de embriones inviables. En ambos casos la viabilidad se reduce.

Debido a que no aparece descendencia viable ni en vegetales ni en animales, parece como si la inversión suprimiera el entrecruzamiento, ya que no se recuperan descendientes en re-

3 *Nota del traductor:* también se llama **puente anafásico**.

lación con gametos recombinados. Sin embargo, en los heterozigotos para la inversión, la inversión tiene el efecto de *suprimir la recuperación de productos recombinados* cuando hay intercambio dentro de la región invertida. Si siempre hubiera entrecruzamiento dentro de una inversión pericéntrica o paracéntrica, el 50 por ciento de los gametos no serían eficaces. Por consiguiente, la viabilidad de los zigotos resultantes quedará muy disminuida. Además, la mitad de los gametos viables tienen el cromosoma con la inversión y la inversión se perpetuará en la especie. El ciclo se repetirá continuamente en las meiosis de generaciones futuras.





Ahora resuelva esto

En el Problema 8.23 de la página 241, se considera a un futuro padre con una historia familiar de nacidos muertos y bebés malformados. Se demostró que tenía una inversión que cubría el 70 por ciento de uno de los dos cromosomas 1. Se le pide que explique la causa de los abortos.

Sugerencia: El cromosoma 1 de la especie humana es metacéntrico, por consiguiente una inversión que cubre el 70 por ciento del cromosoma es sin lugar a dudas una inversión pericéntrica.

Efecto de posición en las inversiones

Otra consecuencia de las inversiones es la nueva posición relativa de unos genes respecto de otros y, especialmente, respecto de regiones del cromosoma que no tiene genes, como la centromérica. Si la expresión del gen está alterada como consecuencia de su reubicación, se puede producir un cambio en el fenotipo. Tal cambio es un ejemplo de lo que se llama efecto de posición, tal como introdujimos mas arriba al discutir la duplicación *Bar*.

También introdujimos el tema del efecto de posición en el Capítulo 4, al hablar de la expresión fenotípica. Como vimos allí, en hembras de *Drosophila* heterozigotas para la mutación recesiva ojos blancos (w^+/w) ligada al sexo, el cromosomas X que lleva el alelo silvestre (w^+) puede sufrir una inversión de tal manera que el locus *white* se sitúe en un posición adyacente al centrómero. Si no hay inversión, una hembra heterozigota tendrá ojos de tipo silvestre, ya que el alelo *white* es recesivo. Las hembras con un cromosoma X con la inversión descrita anteriormente, tendrán los ojos moteados o variegados, es decir, con manchas rojas y blancas. (Véase la Figura 4.18.) La situación del alelo w^+ próxima al centrómero, aparentemente inhibe

FIGURA 8.22 Efectos de un entrecruzamiento dentro de un lazo de inversión en los casos de (a) una inversión paracéntrica y (b) una inversión pericéntrica. En (a), se producen dos cromosomas modificados, uno que es acéntrico y otro que es dicéntrico. Ambos cromosomas tienen también regiones duplicadas y deficientes. En (b), se producen dos cromosomas modificados, ambos con regiones duplicadas y deficientes. Finalmente, el número de gametos viables que resultan de estos hechos se reduce al 50 por ciento, ya que los resultados anormales son probablemente letales.

la expresión del gen normal, dando lugar a la pérdida de la dominancia completa sobre el alelo *w*. Otros genes, localizados también en el cromosoma X, se comportan de la misma manera cuando se reubican de manera similar. A veces se ha advertido reversión a la expresión normal. Cuando esto ocurre, el examen citológico demuestra que la inversión ha reestablecido la secuencia normal del cromosoma.

Ventajas evolutivas de las inversiones

Un efecto importante de una inversión es el mantenimiento de un grupo de alelos concretos de una serie de loci adyacentes, a condición de que se encuentren dentro del segmento invertido. Debido a que en los heterozigotos para una inversión queda suprimida la recuperación de productos recombinados, en los gametos viables se conserva intacta una combinación particular de alelos. Si los alelos de los genes implicados proporcionan una ventaja para la supervivencia de los organismos que los mantienen, la inversión será beneficiosa para la supervivencia evolutiva de la especie.

Por ejemplo, si el grupo de alelos *ABcDef* es más adaptativo que los grupos *AbCdeF* o *abcdEF*, el grupo de genes favorable no se desorganizará por entrecruzamiento si se mantiene dentro de un heterozigoto para la inversión. Como veremos en el Capítulo 26, hay casos documentados de inversiones que son adaptativas de esta manera. Concretamente, Theodosius Dobzhansky demostró que el mantenimiento de inversiones diferentes del cromosoma 3 de *Drosophila pseudoobscura* a lo largo de muchas generaciones ha sido muy adaptativo para esta especie. Parece que ciertas inversiones aumentan de manera característica la supervivencia en condiciones ambientales específicas.

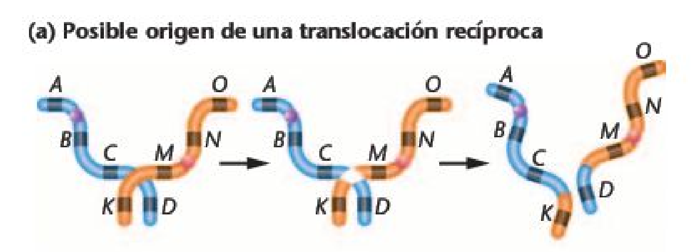
8.10 Las translocaciones alteran la localización de segmentos cromosómicos en el genoma

La translocación, como su nombre indica, es el desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar en el genoma. Por ejemplo, el intercambio de segmentos entre dos cromosomas no homólogos es una **translocación recíproca**. El modo más fácil para que ocurra esto es que los brazos de dos cromosomas no homólogos se aproximen de tal manera que se facilite el intercambio. La Figura 8.23(a) ilustra una translocación recíproca simple en la que sólo se necesitan dos roturas. Si el intercambio incluye segmentos cromosómicos internos, se necesitan cuatro roturas, dos en cada cromosoma.

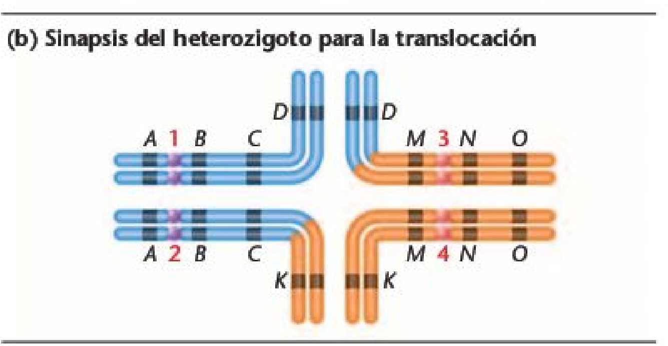
Las consecuencias genéticas de las translocaciones recíprocas son, en varios aspectos, similares a las de las inversiones. Por ejemplo, no hay pérdida o ganancia de información genética; sólo hay una reordenación del material genético. Por consiguiente, la presencia de una translocación no afecta directamente a la viabilidad de los individuos que la llevan. Al igual que la inversión, una translocación puede producir un efecto de posición, debido a que puede reubicar ciertos genes en relación con otros. Este intercambio puede dar lugar a nuevas relaciones de ligamiento que se pueden detectar experimentalmente.

Los homólogos heterozigotos para una translocación recíproca presentan sinapsis complejas en la meiosis. Como se muestra en la Figura 8.23(b), el emparejamiento da lugar a una

(a) Posible origen de una translocación recíproca



(b) Sinapsis del heterozigoto para la translocación



(c) Dos posibles patrones de segregación para dar lugar a la formación de gametos

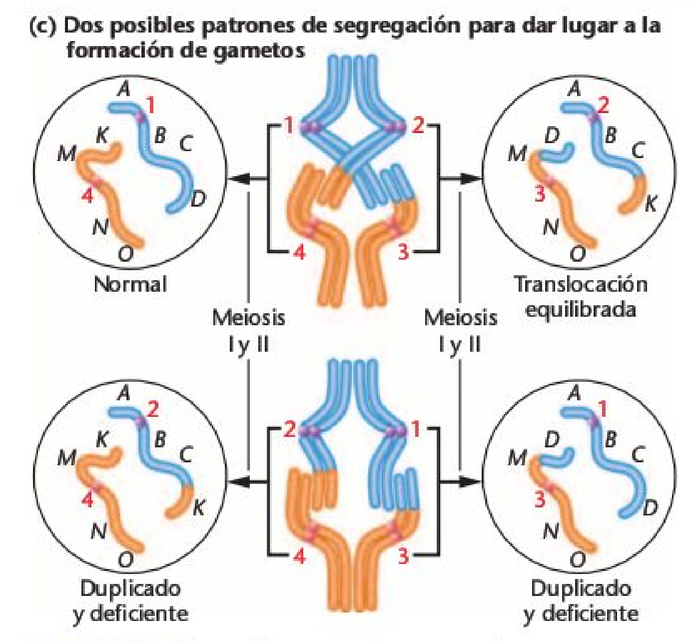


FIGURA 8.23 (a) Posible origen de una translocación recíproca; (b) configuración sináptica formada en la meiosis en un individuo que es heterozigoto para la translocación. (c) Dos posibles patrones de segregación, uno que da lugar a un gameto normal y otro desequilibrado (llamada **segregación alternante**) y otro que da lugar a gametos que tienen duplicaciones y deficiencias (llamada **segregación adyacente**).

configuración en cruz. Como con las inversiones, en la meiosis también se producen gametos genéticamente desequilibrados como consecuencia de este alineamiento no usual. Sin embargo, en el caso de las translocaciones, los gametos aberrantes no son necesariamente la consecuencia del entrecruzamiento. Para ver cómo se producen gametos desequilibrados, fijémonos en los centrómeros homólogos de la Figura 8.23(b) y (c). De acuerdo con el principio de la transmisión independiente, el cromosoma que tiene el centrómero 1 migrará al azar hacia un polo del huso en la primera anafase meiótica; se desplazará *bien* con el cromosoma que tiene el centrómero 3 *o* con el cromosoma que tiene el centrómero 4. El cromosoma con el centrómero 2 se desplazará al otro polo, *bien* con el cromosoma que tiene el centrómero 3 *o* con el cromosoma que tiene el centrómero 4. Esto dará lugar a cuatro posibles productos meióticos. La combinación 1,4 tiene cromosomas que no están implicados en la translocación. Sin embargo, la combinación 2,3 tiene cromosomas translocados. Estos tienen una dotación de información genética completa y están equilibrados. Los otros dos productos posibles, las combinaciones 1,3 y 2,4, tienen cromosomas con segmentos duplicados y con deficiencias[4].

Cuando se incorporan en los gametos, los productos meióticos resultantes son genéticamente desequilibrados. Si participan en la fecundación, dan lugar muy a menudo a letalidad. Sólo el 50 por ciento de los descendientes de padres heterozigotos para una translocación recíproca sobrevivirá. Esta situación, denominada **semiesterilidad**, tiene gran impacto en la eficacia reproductora de los organismos, jugando así un papel en la evolución. Además, en la especie humana, tal situación desequilibrada da lugar a monosomías o trisomías parciales, produciendo una serie de defectos de nacimiento.

Translocaciones en la especie humana: el síndrome de Down familiar

Las investigaciones realizadas desde 1959 han revelado un cierto número de translocaciones en individuos de poblaciones humanas. Un tipo frecuente de translocación, llamada **translocación robertsoniana** o **fusión céntrica**, implica roturas en el extremo final de los brazos cortos de dos cromosomas acrocéntricos no homólogos (13, 14, 15, 21 y 22). Los pequeños fragmentos acéntricos se pierden y los segmentos cromosómicos grandes se fusionan por sus regiones centroméricas, dando lugar a un nuevo cromosoma grande, metacéntrico o submetacéntrico (Figura 8.24). Estos son los tipos de reordenacioness cromosómicas mas frecuentes en la especie humana.

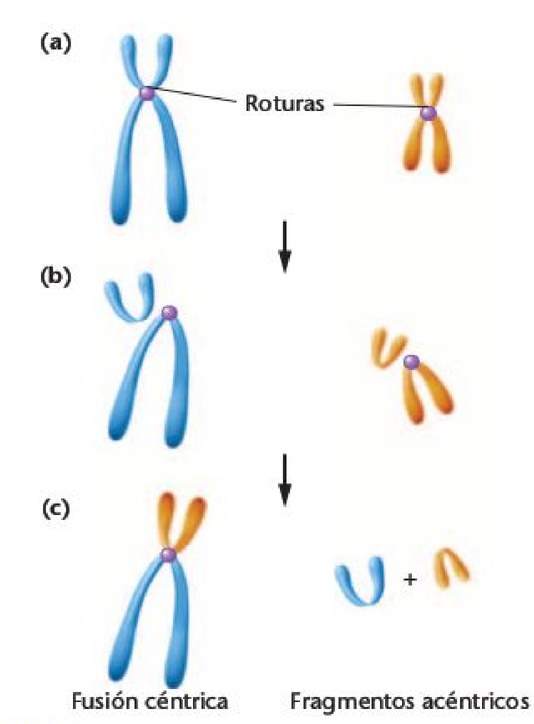


FIGURA 8.24 Posible origen de una translocación Robertsoniana. Dentro de la región centromérica se producen dos roturas independientes en dos cromosomas no homólogos. La fusión céntrica de los brazos largos de los dos cromosomas acrocéntricos da lugar a un nuevo cromosoma. Quedan dos fragmentos acéntricos.

Una translocación como ésta explica los casos familiares en los que el síndrome de Down se hereda. Al comienzo de este capítulo señalábamos que la mayoría de los casos del síndrome de Down se deben a la trisomía del 21, que se produce por una no disyunción en la meiosis de uno de los padres. La trisomía explica el 95 por ciento de todos los casos del síndrome de Down. En tal situación, la probabilidad de que los mismos padres tengan un segundo hijo afectado es extremadamente baja. Sin embargo, en las restantes familias afligidas con un hijo Down, el síndrome aparece en una frecuencia mucho mayor durante varias generaciones.

Los estudios citogenéticos de los padres y de sus descendientes en estos casos raros explican la causa del síndrome de Down familiar. Los análisis revelan que uno de los padres tiene una **translocación 14/21 D/G** (Figura 8.25). Es decir, un padre tiene la mayor parte del cromosoma 21 del grupo G translocado al extremo del cromosoma 14 del grupo D. Este individuo es normal, aun cuando él o ella sólo tengan 45 cromosomas.

En la meiosis, la cuarta parte de los gametos de estos individuos tendrán dos copias del cromosoma 21: un cromosoma normal y la mayor parte de una segunda copia translocada al cromosoma 14. Cuando dicho gameto sea fecundado por un gameto haploide normal, el zigoto resultante tendrá 46 cro-

[4] *Nota del traductor:* hay un tercer tipo posible de combinación, menos frecuente que las anteriores, en donde los centrómeros homólogos pasan al mismo polo, dando lugar a las combinaciones 1,2 y 3,4; estas combinaciones también tiene segmentos duplicados y segmentos deficientes.

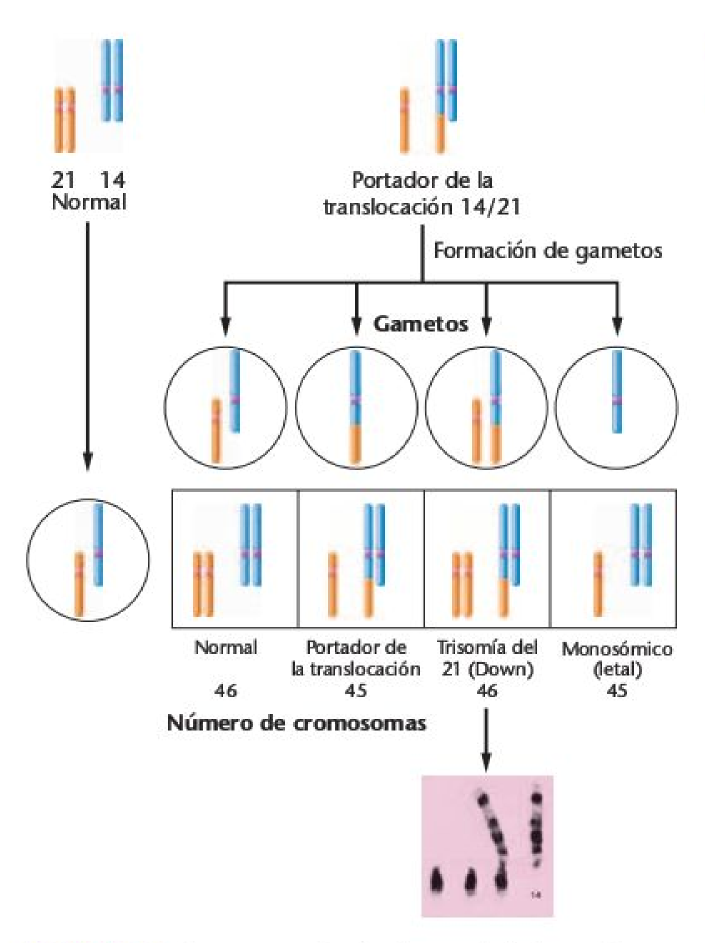


FIGURA 8.25 Cromosomas implicados en el síndrome de Down familiar. La fotografía ilustra los cromosomas relevantes de un descendiente con una trisomía del 21 producida por un padre portador de una translocación.

mosomas, pero con tres copias del cromosoma 21. Estos individuos presentan el síndrome de Down. Otros posibles descendientes viables tienen o bien el genoma diploide normal (sin translocación), o la translocación equilibrada como el padre. Ambos casos dan lugar a individuos normales. El conocimiento de las translocaciones ha permitido a los genéticos resolver la aparente paradoja de un fenotipo trisómico heredado en un individuo con un aparente número diploide de cromosomas.

Es interesante advertir que el portador, que tiene 45 cromosomas y fenotipo normal, no tiene una dotación diploide *completa* de material genético. Al producirse la translocación se ha perdido una pequeña porción, tanto del cromosoma 14 como del 21. Esto ocurre debido a que se han tenido que romper los extremos de ambos cromosomas antes de su fusión. Se sabe que estas regiones concretas son dos de las muchas localizaciones cromosómicas que albergan copias múltiples de los genes que codifican al rRNA, el componente principal de los ribosomas. A pesar de la pérdida de hasta el 20 por ciento de estos genes, el individuo portador no queda afectado.

8.11 En la especie humana los lugares frágiles son susceptibles de roturas cromosómicas

Concluimos este capítulo con una breve discusión de los resultados de un interesante descubrimiento realizado hacia 1970, al observar cromosomas metafásicos de un cultivo de células humanas. En las células de ciertos individuos no se teñía una región concreta de uno de los cromosomas, dando la apariencia de que había un hueco. En otros individuos con cromosomas que presentaban tal morfología, los huecos aparecían en otros lugares de la dotación cromosómica. Tales regiones se conocieron finalmente como **lugares frágiles**, ya que parecían ser susceptible a roturas cromosómicas cuando se cultivaban en ausencia de ciertas sustancias químicas, como el ácido fólico, que normalmente se encuentra en el medio de cultivo. Los lugares frágiles se consideraron al principio como curiosidades, hasta que mas tarde se demostró una gran asociación entre uno de los lugares y un tipo de retraso mental.

La causa de la fragilidad de estos lugares (y de otros) es desconocida. Debido a que representan puntos a lo largo del cromosoma que son susceptibles de rotura, estos lugares pueden indicar regiones en donde la cromatina no está fuertemente espiralizada o compactada. Adviértase que aunque casi todos los estudios de lugares frágiles se han realizado *in vitro*, utilizando células en división mitótica, se ha establecido una clara asociación entre varios de estos lugares y los correspondientes fenotipos alterados, incluidos retraso mental y cáncer.

Síndrome del X frágil (Síndrome de Martin-Bell)

Muchos lugares frágiles no parece que estén asociados con síndrome clínicos. Sin embargo, los individuos que llevan un *lugar sensible al folato* en el cromosoma X (Figura 8.26), presentan el **síndrome del X frágil** (o **síndrome de Martin-**

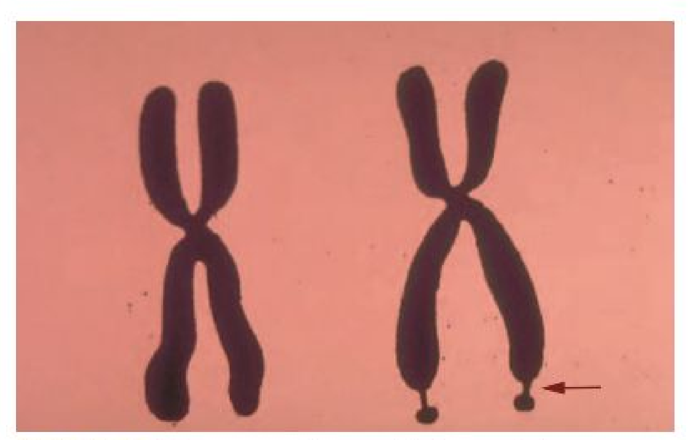


FIGURA 8.26 Cromosoma X normal de la especie humana (izquierda) comparado con un cromosoma X frágil (derecha). El «hueco» (cerca de la parte inferior del cromosoma) está asociado con el síndrome del X frágil.

Bell), la forma mas corriente de retraso mental hereditario. Este síndrome afecta a un varón cada 4.000 y a una mujer cada 8.000. Debido a que es un carácter dominante, las mujeres que llevan sólo un cromosoma X frágil pueden ser retrasadas mentales. Afortunadamente el carácter no tiene penetración completa, por lo que muchos individuos con el defecto genético no están afectados. Además del retraso mental, los individuos afectados presentan a menudo déficit en la atención o comportamiento parecido al autismo. También tienen rostros característicamente alargados y estrechos con mentones sobresalientes, orejas grandes y los varones un tamaño testicular aumentado.

Un gen que suele encontrarse en el lugar frágil es el responsable de este síndrome. Este gen, el *FMR1*, es uno del creciente número de genes descubiertos en donde una secuencia de tres nucleótidos está repetida muchas veces, expandiendo el tamaño del gen. Este fenómeno, llamado **repeticiones de trinucleótidos**, se ha encontrado en otras anomalías de la especie humana, como en la enfermedad de Huntington. En el *FMR1*, el trinucleótido CGG está repetido en un área transcrita, pero no traducida, llamada la 5′UTR —la «región no traducida», que está corriente arriba de la secuencia codificada por el gen. El número de repeticiones varía muchísimo en la población humana y un número elevado está correlacionado directamente con la expresión del síndrome del X frágil. Los individuos normales tienen entre 6 y 54 repeticiones, mientras que aquellos con 55 a 230 repeticiones se consideran «portadores» de la anomalía. Una cantidad por encima de las 230 repeticiones lleva a la expresión del síndrome.

Se cree que cuando el número de repeticiones alcanza este número, las regiones CGG del gen quedan modificadas químicamente de tal manera que las bases de la repetición y de los alrededores son metiladas, dando lugar a la inactivación del gen. El producto normal del gen (FMRP-o proteína del retraso mental del X frágil) es una proteína de unión al RNA que se sabe se expresa en el cerebro. Actualmente se están acumulando pruebas que relacionan directamente la ausencia de la proteína con los defectos mentales asociados con el síndrome.

La proteína es prominente en las células del cerebro en desarrollo y normalmente actúa de lanzadera entre el núcleo y el citoplasma transportando mRNA a los complejos ribosómicos. Se cree que su ausencia en las células dendríticas evita la traducción de otras proteínas críticas durante el desarrollo del cerebro, probablemente de aquellas codificadas por el mRNA transportado por la FMRP. Finalmente, el resultado es un deterioro de la actividad sináptica relacionada con el aprendizaje y la memoria. El análisis molecular ha demostrado que la FMRP es muy selectiva, uniéndose específicamente a los mRNA que tienen un elevado contenido en guanina. Estos mRNA forman estructuras secundarias especiales llamadas **cuartetos-G**, para los que las proteínas tienen una elevada afinidad de unión. Que la posesión de tales cuartetos es importante para el reconocimiento por parte de la FMRP es evidente al examinar casos en donde la formación de estos cuartetos apilados esta inhibida (usando Li^{+}). En tales casos, se anula la unión de la FMRP a estos RNA.

En *Drosophila* se ha identificado el gen homólogo (*dfrx*) del *FMR1* humano y se ha utilizado como modelo experimental para investigación. El producto proteico normal de la mosca de la fruta manifiesta propiedades químicas paralelas a su contrapartida humana. Se han provocado y estudiado mutaciones que o bien expresan más al gen o elimina su expresión. El último caso se denomina mutación nula, en donde el gen ha sido «*knocked out*»[5] utilizando un procedimiento molecular que se utiliza normalmente en biotecnología del DNA. Los resultados de estos estudios demuestran que el gen normal funciona en la formación de la sinapsis y la función sináptica anormal se produce por la pérdida de la expresión del *dfrx*. **Ratones «*knock-out*»** (ratones a los que se les ha escindido experimentalmente uno o mas genes de su genoma; véase el Capítulo 13) que carecen de este gen, también manifiestan un fenotipo similar. Luego, en conclusión, una versión íntimamente emparentada con este gen se conserva en humanos, *Drosophila* y ratones. En las tres especies se ha demostrado que es esencial para la maduración sináptica y el posterior establecimiento de comunicación celular adecuada en el cerebro. En la especie humana, los rasgos neurológicos del síndrome están ligados a la ausencia de su expresión.

Desde el punto de vista genético, uno de los aspectos mas interesantes del síndrome del X frágil es la inestabilidad de las repeticiones CGG. Un individuo con 6 a 54 repeticiones transmite un gen que tiene el mismo número a sus hijos. Sin embargo, aquellos que tienen de 55 a 230 repeticiones, aunque no tienen riesgo de padecer el síndrome pueden transmitir a sus descendientes un gen con un número aumentado de repeticiones. El número de repeticiones continúa aumentando en generaciones futuras, ilustrando el fenómeno conocido como **anticipación genética**, introducido en el Capítulo 4. Una vez que se excede el umbral de 200, la manifestación de la dolencia se hace mas grave en generaciones sucesivas cuando el número de repeticiones de trinucleótidos aumenta.

Aunque el mecanismo que da lugar a la expansión de trinucleótidos no se ha establecido todavía, se conocen varios factores que influyen en la inestabilidad. Lo más significativo es la observación de que la expansión desde el estatus de portador (55 a 200 repeticiones) al estatus de síndrome (más de 200 repeticiones) ocurre en la transmisión del gen por vía materna, pero no por vía paterna. Además, varias investigaciones sugieren que los descendientes masculinos tienen mayor probabilidad que las hijas de recibir un tamaño aumentado de repeticiones que da lugar al síndrome. Obviamente, tenemos que aprender mas acerca de las bases genéticas de la inestabilidad y de la expansión de las secuencias de DNA.

---

[5] *Nota del traductor:* inactivación dirigida de un gen.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

La relación entre los lugares frágiles y el cáncer

Aunque el estudio del síndrome del X frágil fue el primero en llamar la atención a los genéticos sobre regiones cromosómicas inestables, en 1996 Carlo Croce, Kay Huebner y sus colegas comunicaron una segunda conexión entre un lugar frágil y una enfermedad humana. Demostraron una asociación entre un lugar frágil autosómico y el cáncer de pulmón. Muchos años de investigación llevaron a este grupo de investigación a postular que el defecto asociado con este lugar frágil contribuye a la formación de una variedad de tipos tumorales diferentes. Croce y Huebner demostraron primero que el gen *FHIT* (*t*riada de *hi*stidina *f*rágil) localizado en el muy bien definido lugar frágil *FRA3B* (en el brazo p del cromosoma 3), a menudo se altera o se pierde en células tomadas de tumores de individuos con cáncer de pulmón. El análisis molecular de numerosas mutaciones demostró que el DNA había sido roto y vuelto a unir incorrectamente, dando lugar a deleciones dentro del gen *FHIT*. En muchos casos, estas mutaciones daban lugar a la pérdida del producto proteico normal de este gen. Estudios mas amplios han revelado ahora que esta proteína no se encuentra en otros muchos tipos de cáncer, como los del esófago, mama, cuello del útero, riñón, páncreas, colon y estómago. Genes, como el *FHIT*, que están localizados dentro de regiones frágiles presentan indudablemente una mayor susceptibilidad a mutaciones y deleciones.

Ahora tenemos una mejor comprensión de los lugares frágiles, con más de 80 de tales regiones identificadas en la base de datos del genoma humano. Se dice que los lugares frágiles son recombinogénicos, basándose en las observaciones de que dentro de estas regiones cromosómicas se producen frecuentemente translocaciones, intercambio entre cromátidas hermanas (SCE) y otras reordenaciones entre cromosomas. Se cree que las roturas y los huecos asociados con los lugares frágiles son inducidos por agentes que inhiben la replicación del DNA. Por consiguiente, tales roturas y huecos son el resultado de que el DNA ha sido replicado de manera incompleta. La síntesis del DNA en la fase S del ciclo biológico en dichas regiones está retrasada comparada con regiones cromosómicas no frágiles. Esta hipótesis se ha reforzado en el caso de la región *FRA3B*, que se ha demostrado que está caracterizada por un retraso en la replicación del DNA. Por ello, el DNA de esta región no se ha replicado cuando la célula entra en la fase G_2 y posteriormente inicia la mitosis. Los cromosomas metafásicos resultantes revelan huecos y roturas apreciables citogenéticamente en de la región frágil. Si estas roturas se reparan de manera incorrecta durante los puntos de control del ciclo celular, pueden producirse mutaciones específicas del cáncer, si la región tiene genes implicados en el control del ciclo celular.

El *FHIT* es un buen ejemplo y se designa ahora como un gen supresor de tumores. Se cree que el producto del gen normal reconoce el daño genético en las células e induce la apoptosis, por lo que una célula potencialmente maligna es elegida para sufrir muerte celular programada y se destruye de manera efectiva. El fallo para eliminar tales células como consecuencia de la mutación en el gen *FHIT* da lugar a individuos que son particularmente sensibles a daños inducidos por carcinógenos, creando una susceptibilidad al cáncer. Por ejemplo, los fumadores de cigarrillos que desarrollan cáncer de pulmón, tienen una mayor expresión de la región frágil FRA3B que la población normal. Sin embargo, todavía es cuestionable si la alteración de un lugar frágil, que lleva a la inactivación del gen, da lugar al cáncer, *o* si el comportamiento de las células malignas de alguna manera induce las roturas en los lugares frágiles, inactivando o delecionando posteriormente este gen. Otra cuestión importante que se está investigando es el grado de polimorfismo molecular en los lugares frágiles en la población humana, haciendo que algunos individuos sean más susceptibles que otros a los efectos de los carcinógenos. Cualesquiera que sean las respuestas, estos estudios son importantes y apasionantes, y pueden ser valiosos en el futuro para la prevención de los cánceres humanos corrientes y para el desarrollo de una terapia génica.

Huebner, K. & Croce, C. (2003). Cancer and the *FRA3B/FHIT* fragile locus: it's a HIT. *British J. Cancer.* 88:1501-1506

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Las investigaciones sobre la singularidad de la constitución cromosómica de cada organismo ha aumentado aun más nuestra comprensión de la variación genética. Las alteraciones de la dotación diploide de cromosomas se denominan aberraciones cromosómicas o mutaciones cromosómicas.
2. Las desviaciones respecto del número de cromosomas esperado, o las mutaciones en la estructura de los cromosomas, se heredan mendelianamente de modo predecible. A menudo dan lugar a organismos inviables o a cambios sustanciales en el fenotipo.
3. La aneuploidía es la ganancia o pérdida de uno o más cromosomas respecto del contenido diploide, dando lugar a monosomías, trisomías, tetrasomías, etc. El estudio de las anomalías monosómicas y trisómicas ha aumentado nuestra comprensión del delicado equilibrio genético que permite un desarrollo normal.

4. Cuando se añaden dotaciones completas de cromosomas al genoma diploide, se produce poliploidía. Estas dotaciones pueden tener orígenes idénticos o distintos, dando lugar a autopoliploides y alopoliploides, respectivamente.
5. Las deleciones y duplicaciones pueden modificar grandes segmentos del cromosoma. Las deleciones pueden tener graves consecuencias, como el síndrome *cri-du-chat* en la especie humana, mientras que las duplicaciones pueden ser especialmente importantes como origen de redundancia o de genes nuevos.
6. Las inversiones y translocaciones, aunque alteran el orden de los genes en el cromosoma, inicialmente dan lugar a una pequeña o a ninguna pérdida de información genética, sin efectos deletéreos. Sin embargo, las combinaciones heterozigotas pueden dar en la meiosis gametos genéticamente anormales, con un resultado normalmente letal.
7. Los lugares frágiles de los cromosomas mitóticos de la especie humana han iluminado investigaciones interesantes, debido a que tal lugar en el cromosoma X está asociado con el más frecuente de los retrasos mentales hereditarios. Otro lugar frágil, localizado en el cromosoma 3, se ha relacionado con el cáncer de pulmón.

Ideas y soluciones

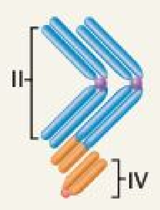
1. En un cruce en el maíz, en el que estaban implicados tres genes ligados, *a, b* y *c,* se retrocruzó con un heterozigoto (*abc*/+++ × *abc*/*abc*). Aun cuando los tres genes estaban separados a lo largo del cromosoma, por lo que se preveía observar los fenotipos resultantes de gametos recombinantes, sólo se recuperaron dos fenotipos: *abc* y +++. Además, el cruce dio lugar, significativamente, a un menor número de semillas viables (y por ello de plantas) de las esperadas. ¿Podría explicar por qué no se recuperaron otros fenotipos y por qué se redujo la viabilidad?

Solución: Uno de los dos cromosomas tiene una inversión que solapa con los tres genes, impidiendo de manera efectiva la recuperación de descendientes «recombinados». Si es una inversión paracéntrica y los genes están claramente separados (asegurando que entre ellos se producirá un número significativo de entrecruzamientos), entonces se formarán numerosos cromosomas acéntricos y dicéntricos, dando lugar a la observada reducción de viabilidad.

2. Se descubrió que un macho de *Drosophila* de una cepa silvestre tenía sólo siete cromosomas, mientras que el número normal de $2n$ es ocho. Un examen detallado reveló que un miembro del cromosoma IV (el cromosoma mas pequeño) estaba unido (translocado) en el extremo distal del cromosoma II y había perdido su centrómero, explicándose así la reducción del número de cromosomas.

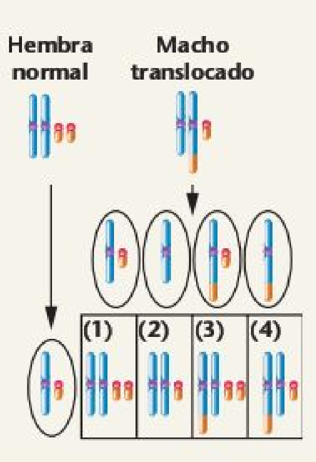
(a) Haga un esquema de todos los miembros de los cromosomas II y IV en sinapsis en la meiosis I.

Solución:



(b) Si este macho se cruza con una hembra con una dotación cromosómica normal, homozigota para la mutación recesiva *eyeless* (*ey*) del cromosoma IV, ¿qué combinaciones cromosómicas se producirán en los descendientes en relación con los cromosomas II y IV?

Solución:



(c) Con referencia a la solución de (b), ¿qué proporciones fenotípicas se producirán en relación con la presencia de ojos, asumiendo que todas las combinaciones cromosómicas sobreviven?

Solución:

(1) normal (heterozigoto)
(2) sin ojos (monosómico, con el cromosoma IV de la madre)
(3) normal (heterozigoto)
(4) normal (heterozigoto)

La proporción final es 3/4 normales:1/4 sin ojos.

3. Si una hembra de *Drosophila* haplo-IV (que tiene un solo cromosoma 4, pero una dotación normal de cromosomas) que tiene ojos blancos (un carácter ligado al X) y quetas normales se cruza con un macho con una dotación diploide de cromosomas y color de ojos normales, pero que es homozigoto para el mutante recesivo de quetas *shaven* (*sv*) del cromosoma 4, ¿qué proporción fenotípica se esperaría en la F_1?

Solución: Consideremos primero sólo el fenotipo del color de los ojos. Es un cruce ligado al X sencillo. Los descendientes serán 1/2 hembras rojas:1/2 machos blancos, como se muestra a continuación:

P$_1$: *ww* hembra blanca × w^+/Y macho rojo

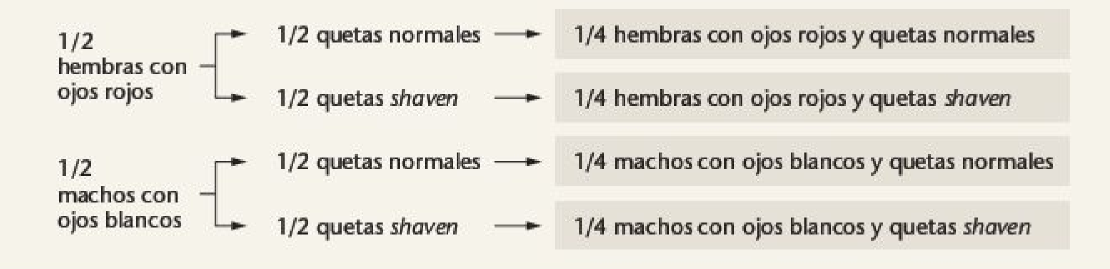
F$_1$: 1/2 ww^+ hembra roja : 1/2 w/Y macho blanco

El fenotipo de las quetas dependerá del hecho de que las hembras P$_1$ con quetas normales producirán gametos, la mitad con un cromosoma 4(sv^+) y la otra mitad sin cromosoma 4 («-« indica ausencia de cromosoma). Después de la fecundación por el esperma de un macho *shaven*, la mitad de los descendientes recibirá dos cromosomas 4 y serán heterozigotos para *sv*, teniendo quetas normales. La otra mitad tendrá sólo un cromosoma 4. Debido a que su origen es paterno, en donde los cromosomas llevan el alelo *sv*, estas moscas serán *shaven* porque no hay alelo silvestre que enmascare a este alelo recesivo:

P$_1$: $sv^+/-$ hembra normal × sv/sv macho *shaven*

F$_1$ 1/2 sv^+/sv machos y hembras = 1/2 tipo silvestre
1/2 $sv/-$ machos y hembras = 1/2 *shaven*

Utilizando el método de la bifurcación en línea, podemos considerar juntos ambos fenotipos, color del ojo y quetas.



PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Para una especie con un número diploide de 18, indicar cuántos cromosomas habrá en los núcleos somáticos de individuos haploides, triploides, tetraploides, trisómicos y monosómicos.
2. Defina y distinga los siguientes pares de términos:

   aneuploidía/euploidía
   monosomía/trisomía
   síndrome de Patau/síndrome de Edwards
   autopoliploide/alopoliploide
   autotetraploide/anfidiploide
   inversión paracéntrica/inversión pericéntrica
3. Contraste los tiempos de supervivencia relativos de individuos con el síndrome de Down, síndrome de Patau y síndrome de Edwards. Especule sobre por qué existen tales diferencias.
4. ¿Qué pruebas sugieren que el síndrome de Down es más a menudo el resultado de una no disyunción durante la oogénesis que durante la espermatogénesis?
5. ¿Qué pruebas existen de que en la concepción de la especie humana se producen cariotipos aneuploides, pero que normalmente son inviables?
6. Contraste la fertilidad de un alotetraploide con la de un autotriploide y un autotetraploide.
7. Cuando se cruzaron dos plantas de especies distintas, pero que pertenecen al mismo género, los híbridos de F$_1$ eran mas viables y tenían mas flores. Desgraciadamente, este híbrido fue estéril y sólo se pudo propagar mediante injertos vegetativos. Explique la esterilidad del híbrido. ¿Cómo podría el horticultor intentar anular su esterilidad?
8. Describa el origen del algodón cultivado americano.
9. Prediga cómo podrían aparecer las configuraciones sinápticas de parejas de cromosomas homólogos cuando un miembro es normal y el otro lleva una deleción o una duplicación.
10. Se dice que la inversiones son «supresoras del entrecruzamiento».¿Es esta terminología técnicamente correcta? Si no es así, vuelva a formular la descripción de manera precisa.
11. Contraste la composición genética de los gametos derivados de tétradas de heterozigotos para una inversión cuando ocurre entrecruzamiento dentro de una inversión paracéntrica y dentro de una inversión pericéntrica.
12. Contraste el locus *Notch* con el locus *Bar* de *Drosophila*. ¿Qué proporciones fenotípicas se producirían en un cruce entre hembras *Notch* y machos *Bar*?
13. Discuta la hipótesis de Ohno sobre el papel de la duplicación génica en el proceso evolutivo y las evidencias que apoyan esta hipótesis.
14. ¿Qué papeles han jugado las inversiones y las translocaciones en el proceso evolutivo?
15. Una mujer con el síndrome de Turner (45,X) expresa también el carácter hemofilia ligado al X, al igual que su padre. ¿Cuál de sus padres sufrió una no disyunción en la meiosis, dando lugar al gameto responsable del síndrome?
16. La primavera, *Primula kewensis*, tiene 36 cromosomas que son similares en apariencia a los cromosomas de dos especies relacionadas, *Primula floribunda* (2n = 18) y *Primula verticillata* (2n = 18). ¿Cómo pudo haber surgido *P. kewensis* de estas especies? ¿Cómo denominaría a *P. kewensis* en términos genéticos?

17. Se sabe que distintas variedades de crisantemos tienen 18, 36, 54, 72 y 90 cromosomas; todos son múltiplos de una dotación básica de 9 cromosomas. ¿Cómo describiría a esas variedades genéticamente? ¿Qué rasgo comparten los cariotipos de estas variedades? Se descubrió una variedad con 27 cromosomas, pero era estéril, ¿por qué?

18. ¿Cuál es el efecto de un raro doble entrecruzamiento dentro de una inversión pericéntrica presente en heterozigosis? ¿Y dentro de una inversión paracéntrica presente en heterozigosis?

19. *Drosophila* puede ser monosómica para el cromosoma 4 y ser fértil. Compare los resultados de F_1 y F_2 de los siguientes cruces, en los que está implicado el carácter recesivo del cromosoma 4 quetas *bent*:

(a) monosómico IV, quetas *bent* × diploide, quetas normales
(b) monosómico IV, quetas normales × diploide, quetas *bent*.

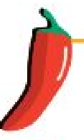
20. *Drosophila* también puede ser trisómica para el cromosoma IV y ser fértil. Predíga los resultados de F_1 y F_2 del cruce trisómico, quetas bent (*b/b/b*) × diploide, quetas normales (b^+/b^+).

21. En cruces entre autotetraploides, las proporciones mendelianas quedan modificadas. Suponga que una planta expresa el carácter dominante verde (semillas) y es homozigota (*BBBB*). Esta se cruza con otra con semillas blancas, que es también homozigota (*bbbb*). Si para producir semillas verdes es suficiente un solo alelo dominante, prediga los resultados de F_1 y F_2 de tal cruce. Suponga que la sinapsis entre los pares de cromosomas se da al azar en la meiosis.

22. Habiendo establecido correctamente la proporción en F_2 del problema anterior, prediga la proporción en F_2 de un cruce «dihíbrido» para dos características que se transmiten independientemente (por ejemplo, $P_1 = BBBBAAAA \times bbbbaaaa$).

23. Una pareja, al planificar el futuro de su familia, era consciente de que a lo largo de las tres generaciones anteriores del lado del varón, se habían producido un número sustancial de nacidos muertos y varios bebés nacidos con malformaciones murieron tempranamente en su niñez. La mujer recomendó al marido visitar una clínica para consejo genético, en donde se realizó un análisis completo de las bandas del cariotipo. Aunque se encontró que tenía la dotación normal de 46 cromosomas, el análisis de las bandas reveló que uno de los miembros de la pareja 1 de cromosomas (del grupo A) tenía una inversión que cubría el 70 por ciento de su longitud. El cromosoma homólogo y el resto presentaban la secuencia normal de bandas.

(a) ¿Cómo se podría explicar la alta incidencia de nacidos muertos en el pasado?
(b) ¿Qué puede predecir acerca de la probabilidad de que los futuros bebes fueran normales o anormales?
(c) ¿Aconsejaría a la mujer «esperar» en cada embarazo hasta el final para así determinar si el feto era normal? Y si no, ¿qué le sugeriría que hiciera?



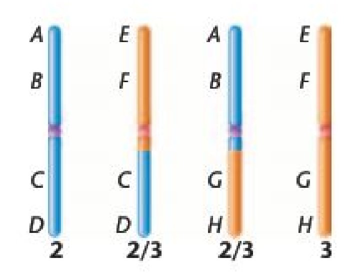
Problemas extra-picantes

24. Se retrocruzó una hembra de *Drosophila*, heterozigota para los genes autosómicos ligados *a, b, c, d* y *e* (*abcde*/+ + + + +) con un macho homozigoto para los alelos recesivos. Aun cuando la distancia entre estos loci era al menos de tres unidades de mapa, sólo se recuperaron cuatro fenotipos, dando lugar a los siguientes resultados.

Fenotipo	N.º de moscas
+ + + + +	440
a b c d e	460
+ + + + *e*	48
a b c d +	52
	Total = 1.000

¿Por qué no aparecen los demás fenotipos recombinantes esperados? ¿Se pueden cartografiar estos loci a partir de los datos anteriores? Si es así, determine sus distancias de mapa.

25. Se encontró que una mujer que pedía consejo genético, era heterozigota para una reordenación cromosómica entre el segundo y el tercer cromosoma. A continuación se esquematizan sus cromosomas, comparados con los de un cariotipo normal:



(a) ¿Qué tipo de aberración cromosómica se muestra?
(b) Con papel y lápiz, demuestre de qué manera se emparejarían estos cromosomas en la meiosis. Asegúrese en rotular los diferentes segmentos de los cromosomas.
(c) Esta mujer era fenotípicamente normal. ¿Le sorprende? ¿Por qué si o por qué no? ¿En qué circunstancias se podría esperar un efecto fenotípico de tal reordenación?
(d) Esta mujer había tenido dos abortos. Viene a verle para pedirle ayuda como consejero genético profesional. Le plantea las siguientes cuestiones: ¿Hay una explicación genética para sus frecuentes abortos? ¿Debería abandonar los intentos de tener un niño propio? Y si no, ¿cuál es la probabilidad de que pudiera tener un niño normal? Proporcione una respuesta razonada a cada una de sus preocupaciones.

26. Una mujer fenotípicamente normal y un varón que tiene displasia ectodérmica anhidrótica, enfermedad de la piel ligada al X, tienen un hijo con el síndrome de Klinefelter (47,XXY). La madre tiene la piel completamente normal. Por el contrario, su hijo tiene áreas de piel normal y áreas de piel anormal.

(a) ¿Cuál de los padres ha contribuido con el gameto anormal?
(b) Utilizando la terminología genética apropiada, describa el error meiótico que se ha producido. Asegúrese de indicar en qué división ha ocurrido el error.
(c) Utilizando la terminología genética adecuada, explique el fenotipo de la piel del hijo.

27. Para investigar el origen de una no disyunción, se examinaron 200 oocitos humanos que no se habían fecundado en un proceso de fecundación *in vitro* (Angel, R. 1997. *Am. J. Hum. Genet.* 61:23-32). Estos oocitos habían completado la meiosis I y estaban detenidos en metafase II (MII). La mayoría (el 67 por ciento) tenía un complemento metafásico MII normal, con 23 cromosomas, cada uno con dos cromátidas hermanas unidas por un centrómero común. Todos los oocitos restantes tenían una composición anormal de cromosomas. Sorprendentemente, si se consideraba la trisomía, ninguno de los oocitos anormales tenía 24 cromosomas.

(a) Interprete estos resultados en relación con el origen de las trisomías, en cuanto a que se refiere a una no disyunción y cuando ocurre. ¿Por qué son sorprendentes los resultados?
   Un gran número de oocitos anormales tenía 22 1/2 cromosomas; es decir, 22 cromosomas mas una sola cromátida que representa a 1/2 cromosoma.
(b) Si tales oocitos prosiguen la meiosis y son fecundados por esperma normal, ¿qué composición cromosómica tendrá el zigoto?
(c) ¿Cómo podría haber surgido el complemento de 22 1/2 cromosomas? Conteste esta pregunta con un dibujo que incluya varios pares de cromosomas MII.
(d) Estos hechos ¿apoyan o refutan la teoría normalmente aceptada en relación con la no disyunción y la trisomía, como se describe en la Figura 8.1?

28. En un estudio genético, se investigó una familia con cinco hijos fenotípicamente normales. Dos eran «homozigotos» para una translocación Robertsoniana entre los cromosomas 19 y 20. (Tenían dos copias idénticas del cromosoma fusionado.) Estos niños tenían 44 cromosomas, pero una dotación genéticamente completa. Tres de los niños eran «heterozigotos» para la translocación y tenían 45 cromosomas, con una cromosoma translocado mas una copia normal de los cromosomas 19 y 20. Otros dos embarazos resultaron nacidos muertos. Se descubrió que los padres eran primos hermanos. Basándose en las informaciones anteriores, determine la composición cromosómica de los padres. ¿Qué provocó la muerte de los nacidos? ¿Por qué el descubrimiento de que los padres eran primos hermanos fue un dato informativo importante para la comprensión de la genética de esta familia?

29. Una niña de 3 años presentaba algunos primeros indicios de padecer el síndrome de Turner, que resulta de una composición cromosómica 45,X. El análisis cariotípico demostró dos tipos de células: 46,XX (normales) y 45,X. Proponga un mecanismo para el origen de este mosaicismo.

30. Se descubrió a una mujer normal con 45 cromosomas, uno de los cuales presentaba una translocación Robertsoniana que contenía gran parte de los cromosomas 18 y 21. Discuta los resultados posibles de su descendencia si su marido tiene un cariotipo normal.

31. En la especie humana, la fibrosis quística (CF) es una dolencia recesiva, caracterizada por secreción mucosa anormal que afecta a los pulmones. Ya que es una dolencia rara, la mayoría de los niños afectados tienen los dos padres portadores heterozigotos. Sin embargo, ocasionalmente, un niño CF tenía sólo uno de sus padres portador. Proponga una explicación para este fenómeno.

LECTURAS SELECCIONADAS

Antonarakis, S.E. 1998. Ten years of genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 51:1-16.

Ashley-Koch, A.E., et al. 1997. Examination of factors associated with instability of the *FMR1* CGG repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 63:776-85.

Beasley, J.O. 1942. Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids, and induced polyploids of *Gossypium*. *Genetics* 27:25-54.

Blakeslee, A.F. 1934. New jimson weeds from old chromosomes. *J. Hered.* 25:80-108.

Boue, A. 1985. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv. Hum. Genet.* 14:1-58.

Carr, D.H. 1971. Genetic basis of abortion. *Annu. Rev. Genet.* 5:65-80.

Croce, C.M., et al. 1996. The *FHIT* genKe at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85:17-26.

DeArce, M.A., and Kearns, A. 1984. The fragile X syndrome: The patients and their chromosomes. *J. Med. Genet.* 21:84-91.

Galitski, T., et al. 1999. Ploidy regulation of gene expression. *Science* 285:251-54.

Gersh, M., et al. 1995. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 56:1404-10.

Hassold, T.J., et al. 1980. Effect of maternal age on autosomal trisomies. *Ann. Hum. Genet.* (London) 44:29-36.

Hassold, T.J., and Hunt, P. 2001. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2:280-91.

Hecht, F. 1988. Enigmatic fragile sites on human chromosomes. *Trends Genet.* 4:121-22.

Hulse, J.H., and Spurgeon, D. 1974. Triticale. *Sci. Am.* (Aug.) 231:72-81.

Kaiser, P. 1984. Pericentric inversions: Problems and significance for clinical genetics. *Hum. Genet.* 68:1-47.

Lewis, E.B. 1950. The phenomenon of position effect. *Adv. Genet.* 3:73-115.

Lewis, W.H., ed. 1980. *Polyploidy: Biological relevance.* New York: Plenum Press.

Lynch, M., and Conery, J.S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicated genes. *Science* 290:1151-54.

Madan, K. 1995. Paracentric inversions: A review. *Hum. Genet.* 96:503-15.

Ohno, S. 1970. *Evolution by gene duplication.* New York: Springer-Verlag.

Oostra, B.A., and Verkerk, A.J. 1992. The fragile X syndrome: Isolation of the *FMR-1* gene and characterization of the fragile X mutation. *Chromosoma.* 101:381-87.

Patterson, D. 1987. The causes of Down syndrome. *Sci. Am.* (Aug.) 257:52-61.

Shepard, J.F. 1982. The regeneration of potato plants from protoplasts. *Sci. Am.* (May) 246:154-66.

Shepard, J.F., et al. 1983. Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. *Science* 219:683-88.

Sutherland, G. 1985. The enigma of the fragile X chromosome. *Trends Genet.* 1:108-11.

Taylor, A.I. 1968. Autosomal trisomy syndromes: A detailed study of 27 cases of Edwards syndrome and 27 cases of Patau syndrome. *J. Med. Genet.* 5:227-52.

Tjio, J.H., and Levan, A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6.

Wharton, K.A., et al. 1985. *opa*: A novel family of transcribed repeats shared by the *Notch* locus and other developmentally regulated loci in *D. melanogaster. Cell* 40:55-62.

Wilkins, L.E., Brown, J.A., and Wolf, B. 1980. Psychomotor development in 65 home-reared children with cri-du-chat syndrome. *J. Pediatr.* 97:401-5.

Herencia extranuclear



Hojas variegadas del arbusto Acanthopanax.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- Muchos caracteres presentan un patrón de herencia que no es biparental, demostrando lo que se llama herencia extranuclear.
- La herencia extranuclear se debe a menudo a la expresión de la información genética que se encuentra en las mitocondrias y cloroplastos.
- Los caracteres determinados por el DNA mitocondrial se transmiten muy a menudo a través del gameto materno.
- Los caracteres determinados por el DNA cloroplástico se pueden transmitir uniparental o biparentalmente.
- La expresión del genotipo materno durante la gametogénesis y el desarrollo temprano puede tener gran influencia en el fenotipo de un organismo.

A lo largo de la historia de la genética, publicaciones ocasionales han desafiado los principios básicos de la genética de la transmisión mendeliana —que el fenotipo se transmite por genes nucleares localizados en los cromosomas de ambos padres. Ciertas observaciones han revelado patrones de herencia que no reflejan los principios mendelianos y algunas indican una aparente influencia extranuclear sobre el fenotipo. Antes de que se estableciera el papel del DNA en la genética, tales observaciones se consideraban normalmente con escepticismo. Sin embargo, con el aumento de conocimientos sobre genética molecular y el descubrimiento del DNA en mitocondrias y cloroplastos, la **herencia extranuclear** se reconoce ahora como un aspecto importante de la genética.

Hay varios tipos de herencia extranuclear. Un tipo importante, referido mas arriba, se describe también como **herencia de orgánulos**. En tales casos, el DNA que se encuentra en las mitocondrias o en los cloroplastos determinan ciertas características fenotípicas de los descendientes. Los casos se reconocen a menudo sobre la base de la transmisión uniparental de estos orgánulos desde la hembra, a través del óvulo, a la descendencia. Un segundo tipo se refiere a la **herencia infecciosa**, que resulta de la simbiosis o de la asociación parasitaria de un microorganismo. En tales casos, el fenotipo heredado está afectado por la presencia de microorganismos en el citoplasma de las células huésped. El tercer tipo se refiere al **efecto materno** sobre el fenotipo, mediante los productos de genes nucleares almacenados en el óvulo y trasmitidos después a través del ooplasma a los descendientes. Estos productos génicos se distribuyen en las células de los embriones en desarrollo e influyen en su fenotipo.

El elemento común de todos estos casos es la transmisión de la información genética a los descendientes a través del citoplasma en lugar de a través del núcleo, muy a menudo a partir de solo uno de los padres. Esto constituirá nuestra definición de «herencia extranuclear.»

9.1 La herencia de orgánulos implica al DNA de cloroplastos y mitocondrias

En esta sección examinaremos ejemplos de patrones de herencia relacionados con la función de cloroplastos y mitocondrias. Sin embargo, antes del descubrimiento del DNA en estos orgánulos, no estaba claro el mecanismo exacto de la transmisión de estos caracteres que vamos a discutir a continuación, excepto que su herencia parecía estar relacionada con algo en el citoplasma en lugar de relacionada con genes nucleares. La transmisión se producía más a menudo a través del ooplasma materno, dando lugar a que el resultado de los cruces recíprocos fuera distinto. Tal patrón se refiere ahora más adecuadamente como herencia de orgánulos.

El análisis de los patrones de herencia que resultan de alelos mutantes en los cloroplastos y en las mitocondrias ha sido difícil por dos razones. Primero, la función de estos orgánulos depende de productos génicos tanto del DNA nuclear como del de los orgánulos. Segundo, cada descendiente recibe muchos orgánulos. En tales casos, si uno o unos pocos de estos tienen un gen mutante, puede no manifestarse el correspondiente fenotipo mutante. Por ello, el análisis es mucho más complejo que para los caracteres mendelianos.

Primero discutiremos varios ejemplos clásicos que finalmente llamaron la atención sobre la herencia de los orgánulos. Luego, en las secciones siguientes, discutiremos la información relativa al DNA y a la función genética resultante en cada orgánulo.

Cloroplastos: la variegación en el dondiego de noche

En 1908, Carl Correns (uno de los redescubridores del trabajo de Mendel) proporcionó el primer ejemplo de herencia relacionada con la transmisión de los cloroplastos. Correns descubrió una variedad del dondiego de noche, *Mirabilis jalapa*, que tenía ramas con hojas blancas, verdes o variegadas. Como se muestra en la Figura 9.1, la herencia, en todas las combinaciones posibles de cruces, está estrictamente determinada por el fenotipo de la parte que proporciona el óvulo. Por ejemplo, si las semillas (que representan a la descendencia) provienen de óvulos que se encuentran en ramas con hojas verdes, todas las plantas hijas tendrán sólo hojas verdes, independientemente del fenotipo de la parte que proporciona el polen. Correns concluyó que la herencia se transmitía a través del citoplasma de la planta femenina, ya que el polen, que contribuye al zigoto con poca o con ninguna cantidad de citoplasma, aparentemente no tenía influencia sobre el fenotipo de la descendencia. Ya que el color de la hoja está relacionada con los cloroplastos, la información genética bien de dichos orgánulos o de alguna manera presente en el citoplasma e influyendo en el cloroplasto, debería ser responsable de este patrón de herencia.

Cloroplastos: Mutaciones en *Chlamydomonas*

El alga unicelular *Chlamydomonas reinhardi* ha proporcionado un excelente sistema para la investigación de la herencia de los plastos. Este organismo eucariota haploide (Figura 9.2) tiene un cloroplasto grande que contiene mas de 50 copias de una molécula de DNA de doble cadena circular. A los cruces que restablecen la diploidía sigue inmediatamente la meiosis y los distintos estadios del ciclo biológico se pueden estudiar fácilmente en cultivos de laboratorio. La primera mutación citoplásmica, la resistencia a la estreptomicina (str^R), la encontró Ruth Sager en 1954. Aunque los dos tipos de apareamiento de *Chlamydomonas*, mt^+ y mt^-, parece que contribuyen con la misma cantidad de citoplasma al zigoto, Sager determinó que el fenotipo str^R lo transmite sólo el padre mt^+ (Figura 9.2). Los cruces recíprocos entre cepas sensibles y resistentes producen resultados diferentes dependiendo del genotipo del padre mt^+, que se expresa en todos los descendientes. Tal como se indica,

	Localización del óvulo		
Origen del polen	Rama blanca	Rama verde	Rama variegada
Rama blanca	Blanca	Verde	Blanca, verde o variegada
Rama verde	Blanca	Verde	Blanca, verde o variegada
Rama variegada	Blanca	Verde	Blanca, verde o variegada



FIGURA 9.1 Descendientes del cruce entre flores de varias ramas de plantas variegadas del dondiego de noche. La fotografía muestra la planta del dondiego de noche.

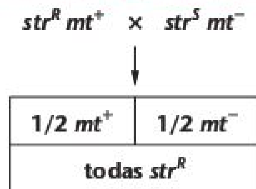
la mitad de los descendientes son mt^+ y la otra mitad mt^-, indicando que el tipo de apareamiento está controlado por un gen nuclear que segrega de modo mendeliano.

Desde el descubrimiento de Sager se han descubierto una serie de mutaciones en *Chlamydomonas* (como resistencia a, o dependencia de, una serie de antibióticos bacterianos) que demuestran un patrón de herencia uniparental similar. Todas estas mutaciones se han relacionado con la transmisión del cloroplasto y su estudio ha ampliado nuestro conocimiento sobre la herencia de los cloroplastos.

Después de la fecundación, que implica la fusión de dos células de tipos de apareamiento opuestos, los cloroplastos de los dos tipos de apareamiento se fusionan. Después de que el zigoto resultante haya sufrido meiosis y se hayan producido células haploides, está claro que la información genética de los cloroplastos de las células hijas deriva sólo del padre mt^+. La información genética presente en el cloroplasto de mt^- degenera.

Es interesante advertir que en *Chlamydomonas* la herencia de los fenotipos afectados por las mitocondrias es también uniparental. Sin embargo, los estudios de transmisión de varios casos de resistencia a antibióticos han demostrado que es el padre mt^- el que transmite la información genética a la descendencia. Esto es exactamente lo contrario de lo que ocurre con los fenotipos derivados de cloroplastos, como str^R. No se ha averiguado el significado de heredar un orgánulo de un padre y el otro orgánulo del otro padre.





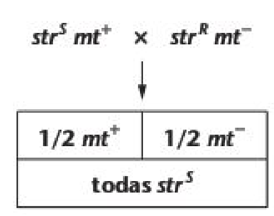


FIGURA 9.2 Resultados de los cruces recíprocos entre cepas resistentes a la estreptomicina (str^R) y cepas sensibles (str^S) del alga verde *Chlamydomonas* (que se muestra en la fotografía).

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se averiguó que fenotipos concretos se heredan como resultado de la información genética presente en los cloroplastos en lugar de en el núcleo?

Ahora resuelva esto

En el Problema 9.8(b) de la página 261 se le pide que considere el resultado de cruces para una mutación en Chlamydomonas y que proponga cómo se produce la herencia del carácter.

Sugerencia: Considere las dos posibilidades, que la herencia del carácter es uniparental o biparental.

Mutaciones mitocondriales: El caso de *poky* en *Neurospora*

Se han descubierto y estudiado mutaciones que afectan a la función mitocondrial, que revelan que las mitocondrias también tienen un sistema genético propio. Las mutaciones mitocondriales, como las de los cloroplastos, se transmiten a través del citoplasma. En la discusión actual, subrayaremos la relación entre las mutaciones mitocondriales y los patrones de herencia extranuclear resultantes.

En 1952, Mary B. Mitchell y Hershel K. Mitchell estudiaron el hongo del pan *Neurospora crassa* (Figura 9.3). Descubrieron una cepa mutante de crecimiento lento que denominaron *poky* (perezoso) (también se denomina *mi-1*, por *maternal inheritance*). El crecimiento lento está asociado con daño en la función mitocondrial, específicamente ocasionada por la ausencia de varios citocromos esenciales para el transporte de electrones. En ausencia de los citocromos, la respiración aeróbica que conduce a la síntesis de ATP está reducida.

Los resultados de los cruces entre cepas silvestres y *poky* sugieren que el carácter se hereda por vía materna. Si la hembra es *poky* y el macho silvestre, todas las colonias hijas son *poky*. Los cruces recíprocos producen colonias de tipo silvestre.

Los estudios con mutantes *poky* demuestran que, ocasionalmente, hifas de micelios distintos se fusionan y dan lugar a estructuras que tienen dos o más núcleos en un citoplasma común. Si la hifa tiene núcleos de genotipos distintos, la estructura se denomina un **heterocarión**. El citoplasma tendrá mitocondrias derivadas de ambos micelios. Un heterocarión puede dar lugar a esporas, o conidios, haploides que producen micelios nuevos.

Heterocariones producidos por la fusión de hifas *poky* y silvestres presentan inicialmente tasas normales de crecimiento y respiración. Sin embargo, los micelios que se producen a partir de los conidios se vuelven progresivamente más anormales hasta que presentan el fenotipo *poky*. Esto ocurre a pesar de la supuesta presencia de ambos tipos de mitocondrias, silvestre y *poky*, en el citoplasma de las hifas.

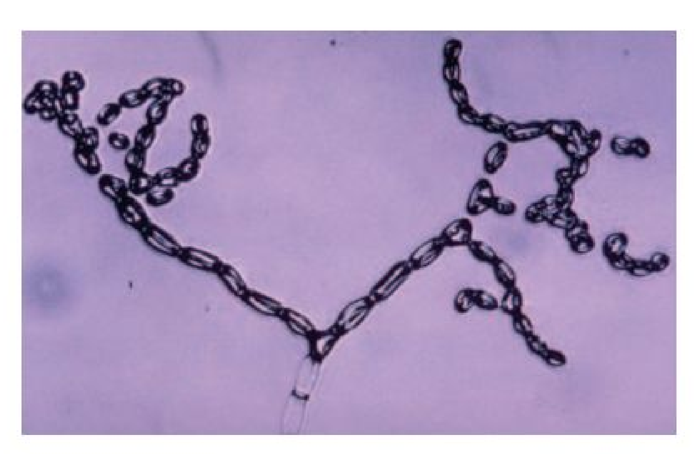
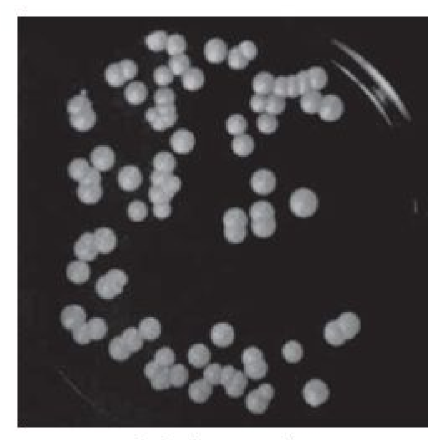


FIGURA 9.3 Micrografía ilustrando el crecimiento del hongo rosa del pan *Neurospora crassa*.

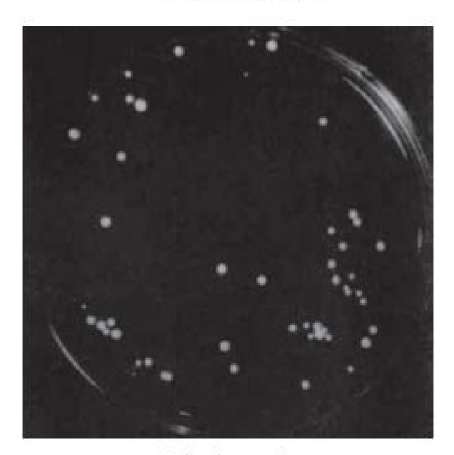
Para explicar los patrones iniciales de crecimiento y respiración, se supone que las mitocondrias normales proporcionan las necesidades respiratorias de la hifa. La expresión posterior del fenotipo *poky* sugiere que la presencia de las mitocondrias *poky* puede impedir o deprimir la función de estas mitocondrias silvestres. Quizá la mitocondria *poky* se reproduce más rápidamente y diluye numéricamente a las mitocondrias silvestres. Otra posibilidad es que las mitocondrias *poky* produzcan una sustancia que inactive a los orgánulos normales o interfiera con la replicación de su DNA (mtDNA). A causa de este tipo de interacción, *poky* es un ejemplo de una amplia categoría de mutaciones supresoras, en la que también pueden incluirse muchas otras mutaciones mitocondriales de *Neurospora* y levaduras.

Petites en *Saccharomyces*

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha llevado a cabo otro amplio estudio de mutaciones mitocondriales. La primera de tales mutaciones, descrita por Boris Ephrussi y colaboradores en 1956, se denominó *petite* debido al pequeño tamaño de las colonias de levadura (Figura 9.4). Desde entonces se



Colonias normales



Colonias *petite*

FIGURA 9.4 Comparación de colonias normales respecto de petite en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

han descubierto y estudiado muchas mutaciones *petite* distintas, y todas ellas tienen una característica en común: son deficientes en la respiración celular debido a un transporte de electrones anormal. Debido a que este organismo es un anaerobio facultativo y puede crecer fermentando glucosa mediante glicolisis, puede sobrevivir a la pérdida de la función mitocondrial generando energía anaeróbicamente.

En la Figura 9.5 se esquematiza la genética compleja de las mutaciones petite. Una pequeña proporción de estos mutante presentan herencia mendeliana y por ello se llaman *petites segregacionales*. Las restantes presentan transmisión citoplásmica, dando lugar a uno de los dos efectos en los cruces. Cuando se cruzan *petites neutrales* con el tipo silvestre, sus productos meióticos (llamados ascosporas) dan lugar sólo a colonias normales. El mismo patrón continua si se retrocruzan estos descendientes con petites neutrales. Ya que la mayoría de las neutrales carecen totalmente de mtDNA o han perdido una parte sustancial del mismo, para que los descendientes sean normales, deben heredar también mitocondrias normales capaces de respiración aerobia después de la reproducción. Por ello, en las levaduras, las mitocondrias se heredan de ambos padres. Las mitocondrias funcionales se replican en los descendientes y mantienen una función mitocondrial normal.

El tercer tipo mutacional, las ***petite supresivas***, se comportan de manera similar a las *poky* de *Neurospora*. Los cruces entre mutantes y normales dan lugar a zigotos diploides mutantes que, después de la meiosis, producen inmediatamente células haploides que son todas mutantes. Suponiendo que los descendientes han recibido mitocondrias de ambos padres, la mutación *petite* se comporta de manera «dominante» y parece que suprime la función de las mitocondrias silvestres. Las *petite supresivas* también tiene deleciones en el mtDNA, pero no son tan grandes como las deleciones de las *petite neutrales*.

Para explicar la supresividad se han avanzado dos hipótesis principales que se centran alrededor del DNA organular. Una explicación sugiere que el DNA mutante (o delecionado) de las mitocondrias (mtDNA) se replica más rápidamente, dando lugar a que las mitocondrias mutantes «sobrepasen» o dominen en fenotipo sólo por número. La segunda explicación sugiere que la recombinación que se da entre el mtDNA mutante y silvestre, introduce errores en el mtDNA normal o lo desorganiza. No está claro cuál de estas explicaciones es la correcta, si es que lo es alguna.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿De qué manera el descubrimiento de tres tipos de mutaciones petite en la levadura llevo a los investigadores a postular herencia extranuclear en el tamaño de las colonias?

Ahora resuelva esto

El Problema 9.4 de la página 261 se refiere a una nueva mutación petite aislada, que se cruza con cepas de levadura normales y se le pide que deduzca conclusiones acerca de la mutación petite.

Sugerencia: Recuerde que en la levadura, la herencia de las mitocondrias es biparental.

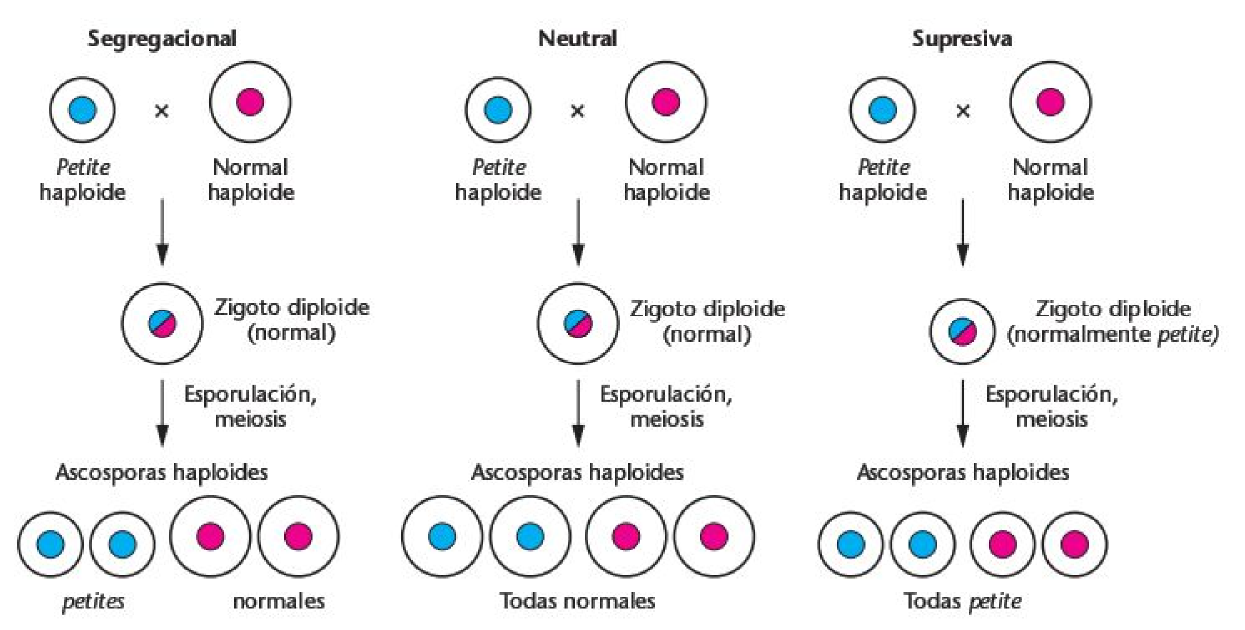


FIGURA 9.5 Resultado de los cruces de los tres tipos de mutaciones petite que afectan a la función mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

9.2 El conocimiento del DNA mitocondrial y cloroplástico nos ayuda a explicar la herencia de los orgánulos

La primera vez que se sugirió que tanto mitocondrias como cloroplastos tienen su propio DNA y un sistema para expresar su información genética, fue por el descubrimiento de mutaciones y de los patrones de herencia resultantes en plantas, levaduras y otros hongos. Ya que tanto mitocondrias como cloroplastos se heredan a través del citoplasma materno en muchos organismos y ya que cada uno de los primeros ejemplos se puede relacionar teóricamente con la alteración de funciones en cloroplastos o mitocondrias, los genéticos comenzaron a buscar más pruebas directas del DNA de estos orgánulos. No sólo fue singular encontrar DNA como componente normal de mitocondrias y cloroplastos, sino que también un examen cuidadoso de la naturaleza de esta información genética proporcionó claves esenciales sobre el origen evolutivo de estos orgánulos.

El DNA de los orgánulos y la teoría endosimbiótica

Los microscopistas electrónicos no solo documentaron la presencia de DNA en mitocondrias y cloroplastos sino que también vieron que esta molécula tiene una forma completamente distinta de la que se observa en el núcleo de las células eucariotas que albergan estos orgánulos (Figuras 9.6 y 9.7). Este DNA es notablemente similar al que se observa en las bacterias! Esta semejanza, junto con la observación de un sistema genético único capaz de transcripción y traducción específica en los orgánulos, condujo a Linn Margulis y otros a postular la **teoría endosimbiótica**. Básicamente, la teoría expone que las mitocondrias y los cloroplastos surgieron independientemente



FIGURA 9.6 Micrografía electrónica del DNA de cloroplasto de lechuga.

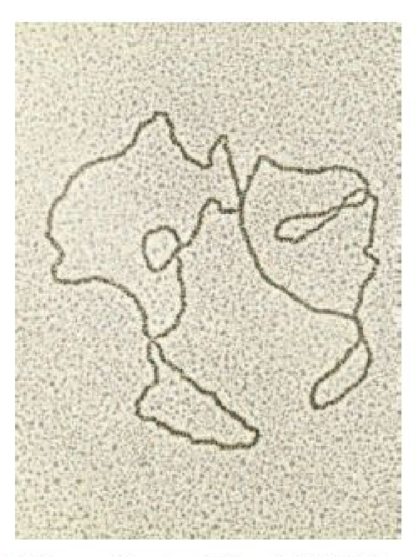


FIGURA 9.7 Micrografía electrónica del DNA de mitocondria de *Xenopus levis*.

hace unos 2.000 millones de años a partir de protobacterias de vida libre que tenían las capacidades atribuidas ahora a estos orgánulos —respiración aeróbica y fotosíntesis, respectivamente. Esta idea propone que las antiguas bacterias fueron englobadas por células eucariotas primitivas más grandes, que originalmente carecían de la capacidad de respiración aerobia o de capturar energía de la luz solar. Posteriormente se desarrolló una relación simbiótica beneficiosa, en donde las bacterias perdieron finalmente su capacidad para funcionar de manera autónoma, mientras que las células eucariotas hospedantes ganaron la capacidad de tener respiración oxidativa o fotosíntesis, como pudo ser el caso. Aunque algunas cuestiones quedan sin respuesta, continúan acumulándose evidencias en apoyo de esta teoría, y sus principios básicos se aceptan ampliamente.

Un breve examen actualizado de las mitocondrias nos ayudará a entender mejor la teoría endosimbiótica. A lo largo del posterior curso de la evolución que siguió a la invasión, surgieron ramas distintas de organismos eucariotas. Con el progreso evolutivo, las bacterias compañeras también sufrieron sus propios cambios independientemente. La primera alteración fue la transferencia de muchos genes de las bacterias invasoras al núcleo del huésped. Los productos de estos genes, aunque funcionan todavía en el orgánulo, no obstante están ahora codificados y transcritos en el núcleo y traducidos en el citoplasma antes de su transporte al orgánulo. La cantidad de DNA que permanece actualmente en el genoma de una mitocondria típica es minúscula en comparación con la de las bacterias de vida libre de las que derivaron. Los orgánulos mas ricos en genes tienen ahora menos del 10 por ciento de los genes presentes en las bacterias mas pequeñas conocidas.

Cambios similares han caracterizado la evolución de los cloroplastos. En las siguientes secciones exploraremos con cierto detalle lo que se sabe actualmente acerca de cloroplastos y mitocondrias.

¿CÓMO LO SABEMOS?

Si asumimos que la teoría endosimbiótica es cierta, ¿qué observaciones experimentales apoyaron esta creencia?

Organización molecular y productos génicos del DNA de cloroplastos

En la actualidad se han solucionado los detalles en relación con el sistema genético autónomo de los cloroplastos, que han proporcionado nuevos apoyos a la teoría endosimbiótica. Los cloroplastos, responsables de la fotosíntesis, tienen DNA como base de información genética y un sistema completo de síntesis proteica. Los componentes moleculares de la traducción en los cloroplastos están en conjunto derivados tanto de la información genética nuclear como de la del cloroplasto.

El DNA del cloroplasto (cpDNA), que se muestra en la Figura 9.6, tiene un tamaño bastante uniforme en organismos diferentes, alcanzando un tamaño entre 100 y 225 kb. Comparte muchas semejanzas con el DNA que se encuentra en las células procariotas. Es circular, de doble cadena, se replica semiconservativamente y no está asociado a las proteínas características del DNA eucariota. Comparado con el DNA nuclear del mismo organismo, muestra invariablemente una densidad de flotación y composición de bases distinta.

El tamaño del cpDNA es mucho mayor que el del mtDNA. En cierto grado, esto se puede explicar por un incremento en el número de genes. Sin embargo, la mayor diferencia parece que se debe a la presencia en el cpDNA de muchas secuencias largas de nucleótidos no codificantes, tanto entre como dentro de los genes, siendo las últimas intrones. También hay duplicaciones de muchas secuencias de DNA. Ya que tales secuencias no codificantes varían en plantas distintas, esto es indicativo de la evolución independiente que se ha producido en los cloroplastos después de su invasión de una célula eucariota primitiva.

En el alga verde *Chlamydomonas* hay unas 75 copias del DNA cloroplástico por orgánulo. Cada copia consta de unas 195.000 pb (195 kb). En las plantas superiores, como en el guisante de olor, también hay en cada orgánulo copias múltiples de la molécula de DNA, pero la molécula (134 kb) es considerablemente mas pequeña que la de *Chlamydomonas*. Es interesante que se haya documentado en algunos organismos recombinación entre las copias múltiples de DNA dentro del cloroplasto.

Numerosos productos génicos codificados por el DNA cloroplástico funcionan durante la traducción dentro del orgánulo. Por ejemplo, en distintas plantas superiores (alubias, lechuga, espinacas, maíz y avena), hay dos grupos de genes que codifican el RNA ribosómico —rRNA de 5*S*, 16*S* y 23*S*. Además, el DNA de los cloroplastos codifica numerosos tRNA, así como muchas proteínas ribosómicas específicas de los ribosomas de los cloroplastos. Por ejemplo, en las hepáticas, cuyo cpDNA fue el primero en secuenciarse, hay genes que codifican 30 tRNA, polimerasa del RNA, múltiples rRNA y numerosas proteínas ribosómicas. La variación de los productos génicos codificados en el cpDNA en plantas distintas prueba de nuevo la evolución independiente que se dio en los cloroplastos.

Los ribosomas de los cloroplastos tienen un coeficiente de sedimentación menor de 70S, similar, aunque no idéntico, a los ribosomas bacterianos. Aun cuando algunas proteínas ribosómicas del cloroplasto están codificadas por el cpDNA y otras por el DNA nuclear, muchas, si no todas, de tales proteínas son diferentes de sus homólogas presentes en los ribosomas citoplásmicos. Ambas observaciones proporcionan un apoyo directo a la teoría endosimbiótica.

Se han identificado también otros genes de los cloroplastos, específicos para la función fotosintética. Por ejemplo, en las hepáticas, hay 92 genes cloroplásticos que codifican proteínas que se encuentran en la membrana tilacoide, el componente celular intrínseco para las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis. Las mutaciones de estos genes pueden inactivar la fotosíntesis. Una distribución típica de genes entre el núcleo y el cloroplasto se ilustra en una de las principales enzimas fotosintéticas, la ribulosa-1-5-difosfato carboxilasa (Rubisco). Esta enzima tiene su subunidad pequeña codificada por un gen nuclear, mientras que la subunidad grande está codificada por el cpDNA.

Organización molecular de los productos génicos del DNA mitocondrial

También se dispone de amplia información en relación con los aspectos moleculares y los productos génicos del DNA mitocondrial (mtDNA). En muchos eucariotas, el mtDNA es un círculo cerrado (Figura 9.7) de doble cadena que se replica semiconservativamente y que no tiene las proteínas cromosómicas características del DNA de los eucariotas. Una excepción se encuentra en algunos protozoos ciliados, en los que el DNA es lineal.

El tamaño del mtDNA es mucho menor que el del cdDNA y varia mucho entre organismos, como se demuestra en la Tabla 9.1. En una serie de animales, incluida la especie humana, el mtDNA consta de 16.000 a 18.000 bp (16 a 18 kb). Sin

TABLA 9.1 TAMAÑO DEL MTDNA DE DIVERSOS ORGANISMOS

Organismos	Tamaño (kb)
Humanos	16,6
Ratones	16,2
Xenopus (rana)	18,4
Drosophila (mosca de la fruta)	18,4
Saccharomyces (levadura)	75,0
Pisum sativum (guisante)	110,0
Arabidopsis (planta de la mostaza)	367,0

embargo, en la levadura (*Saccharomyces*), el mtDNA es de 75 kb. Las plantas exceden típicamente este tamaño —en las mitocondrias de la mostaza, *Arabidopsis*, el tamaño es de 367 kb. Los vertebrados tienen de 5 a 10 moléculas de tal DNA por orgánulo, mientras que las plantas tienen de 20 a 40 copias por orgánulo.

Se puede decir muchas otras cosas acerca del mtDNA. Con raras excepciones, en los genes mitocondriales no hay intrones (las secuencias intercaladas no codificantes características del DNA nuclear) y las repeticiones de genes son raras. Tampoco es frecuente la presencia del DNA espaciador intergénico. Esta descripción es aplicable particularmente a especies cuyo mtDNA es bastante más pequeño, como en la especie humana. Sin embargo, en *Saccharomyces*, con una molécula de DNA más grande, gran parte del exceso de DNA se explica por la presencia de intrones y de DNA espaciador intergénico.

Como se discutirá en el Capítulo 14, la expresión de los genes mitocondriales presentan varias modificaciones del, por otras parte, código genético estándar. La replicación depende de enzimas codificadas por el DNA nuclear. En la especie humana el mtDNA codifica dos RNA ribosómicos (rDNA), 22 RNA de transferencia (tRNA) así como 13 polipéptidos esenciales para las funciones respiratorias oxidativas de los orgánulos. En muchos casos, estos polipéptidos son parte de proteínas multicadena, en donde las otras subunidades de cada proteína son a menudo codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citoplasma y transportadas al orgánulo. Asi, el sistema de síntesis de proteínas y los componentes moleculares de la respiración celular derivan conjuntamente de genes nucleares y mitocondriales.

Otra observación es que en el mtDNA de los vertebrados, las dos cadenas tienen densidades distintas cuando se examinan por centrifugación. Esto sirve de base para designar a las cadenas como pesada (H) y ligera (L). Es interesante indicar que mientras que la mayoría de los genes mitocondriales están codificados por la cadena H, sólo unos pocos están codificados por la cadena L.

Como podría predecirse por la hipótesis endosimbiótica, los ribosomas que se encuentran en el orgánulo son diferentes de los que se encuentran en el citoplasma vecino. En la Tabla 9.2 se muestra que los ribosomas mitocondriales de especies diferentes varían considerablemente en sus coeficientes de sedimentación, desde 55*S* a 80*S*, mientras que los ribosomas citoplásmicos tienen 80*S* de manera uniforme.

Los productos génicos codificados por el núcleo, esenciales para la actividad biológica de las mitocondrias, son muy numerosos. Por ejemplo, incluyen polimerasas del DNA y del RNA, factores de iniciación y elongación esenciales para la traducción, proteínas ribosómicas, aminoacil tRNA sintetasas y varias especies de tRNA. Estos componentes importados son distintos de sus homólogos citoplásmicos, aun cuando ambos grupos son codificados por genes nucleares. Por ejemplo, las enzimas sintetasas esenciales para cargar las moléculas de tRNA mitocondrial (un proceso esencial en la traducción) presentan una afinidad distinta para las especies de tRNA mitocondrial cuando se compara con los tRNA citoplásmicos. Se ha observado algo parecido en los factores de iniciación y elongación. Además, mientras que las polimerasas del RNA bacteriano y nuclear se sabe que están compuestas de numerosas subunidades, las variedades mitocondriales constan de una sola cadena polipeptídica. En general esta polimerasa es sensible a los antibióticos que inhiben la síntesis de RNA bacteriano, pero que no inhiben a las eucarióticas. En la Figura 9.8 se comparan las distintas contribuciones de los productos génicos nucleares y mitocondriales.

TABLA 9.2 **COEFICIENTES DE SEDIMENTACIÓN DE RIBOSOMAS MITOCONDRIALES**

Reino	Ejemplos	Coeficiente de sedimentación (S)
Animales	Vertebrados	55-60
	Insectos	60-71
Protistas	*Euglena*	71
	Tetrahymena	80
Hongos	*Neurospora*	73-80
	Saccharomyces	72-80
Vegetales	Maíz	77



En el Problema 9.13 de la página 261 se le pide que explique el número de moléculas de tRNA diferentes codificadas por el DNA mitocondrial humano en contraste con el número real que se necesita para la traducción de proteínas dentro del orgánulo.

Sugerencia: Las mutaciones en ciertos genes nucleares tiene efecto sobre la función mitocondrial.

9.3 Las mutaciones en el DNA mitocondrial dan lugar a enfermedades en la especie humana

El DNA que se encuentra en las mitocondrias de la especie humana ha sido completamente secuenciado y tiene 16.569 pb. Como se mencionó anteriormente, los productos génicos mitocondriales son los siguientes:

13 proteínas, necesarias para la respiración aeróbica celular;

22 RNA de transferencia (tRNA), necesarios para la traducción;

2 RNA ribosómicos (rRNA), necesarios para la traducción.

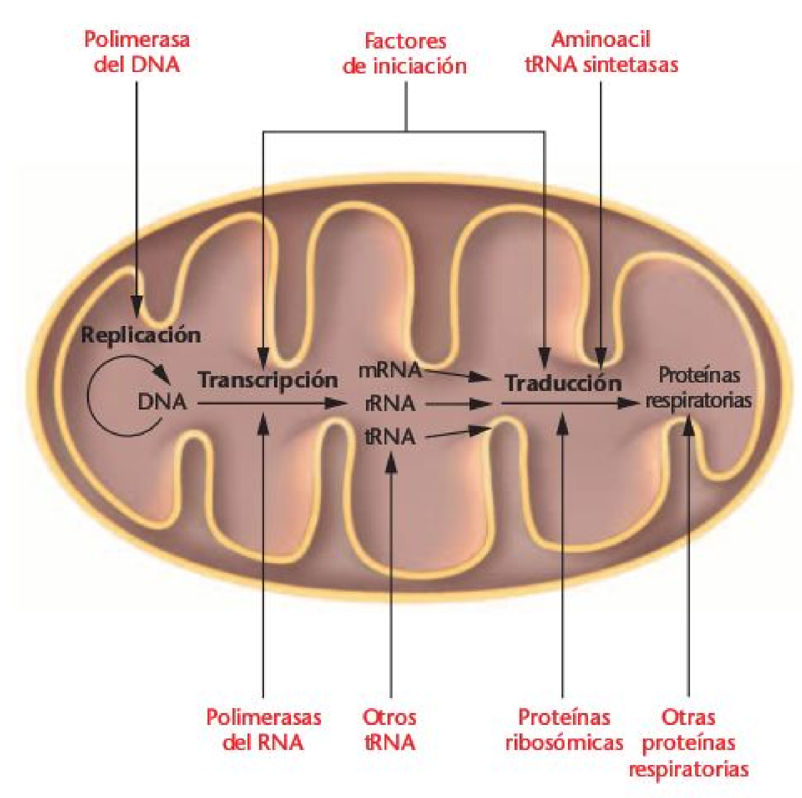


FIGURA 9.8 Productos génicos esenciales para la función mitocondrial. Aquellos que entran en el orgánulo se derivan del citoplasma y están codificados por genes nucleares.

Ya que el suministro energético celular depende en gran medida de la respiración celular aeróbica, la alteración de cualquier gen mitocondrial por mutación, puede tener potencialmente un grave impacto en el organismo. Hemos visto esto en nuestra discusión anterior sobre los mutantes *petite* de levadura, que sería una mutación letal si no fuera porque este organismo puede respirar anaeróbicamente. De hecho, el mtDNA es particularmente vulnerable a las mutaciones. Hay dos posibles razones. Primero, la capacidad para reparar daños en el mtDNA puede no ser equivalente a la del DNA nuclear. Segundo, la concentración de radicales libres altamente mutagénicos generados por la respiración celular que se acumulan en un espacio muy reducido, probablemente elevan la tasa de mutación en el mtDNA.

Afortunadamente, el zigoto recibe un gran número de orgánulos a través del óvulo, por lo que si solo un orgánulo o muy pocos contienen una mutación, su impacto es muy reducido por las muchas mitocondrias que carecen de la mutación y funcionan con normalidad. En el desarrollo temprano, la división celular dispersa la población inicial de mitocondrias presentes en el zigoto y en las células nuevas que se forman, estos orgánulos se reproducen de manera autónoma. Por consiguiente, si aparece o está presente una mutación deletérea en la población inicial de orgánulos, los adultos tendrán células con una mezcla variable de orgánulos normales y anormales. Esta situación se denomina **heteroplasmia**.

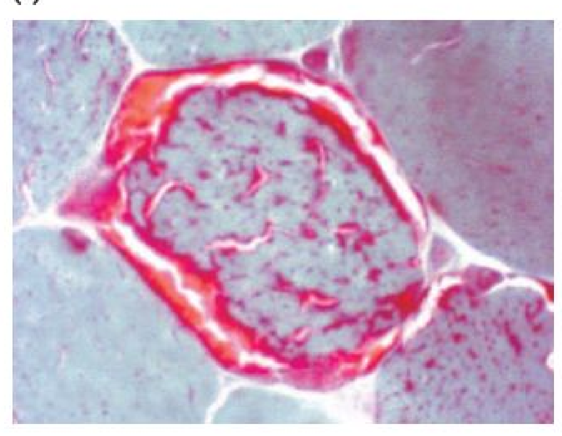
Para poder atribuir una enfermedad humana a mitocondrias alteradas genéticamente, se deben cumplir varios criterios:

1. La herencia debe tener un patrón materno en lugar de mendeliano.
2. El trastorno debe reflejar una deficiencia en la función bioenergética del orgánulo.
3. Tiene que haber una mutación concreta en uno o más genes mitocondriales.

Hasta el momento, se sabe que varios trastornos humanos presentan estas características. Por ejemplo, la **epilepsia mioclónica y enfermedad de las miofibrillas rojas deshilachadas (MERFF)** demuestran un patrón de herencia consistente con la herencia materna. Sólo los descendientes de madres afectadas heredan el trastorno; los descendientes de padres afectados son todos normales. Los individuos con este raro trastorno manifiestan ataxia (carencia de coordinación muscular), sordera, demencia y ataques epilépticos. La enfermedad se llama así debido a la presencia de fibrillas del músculo esquelético «deshilachadas y rojas» que presentan manchas rojas resultantes de la proliferación de mitocondrias aberrantes (Figura 9.9). La función cerebral, que también tiene una gran demanda de energía, esta afectada en esta enfermedad, dando lugar a síntomas neurológicos.

El análisis del mtDNA de pacientes con MERRF ha revelado una mutación en uno de los 22 genes mitocondriales

(a)



(b)

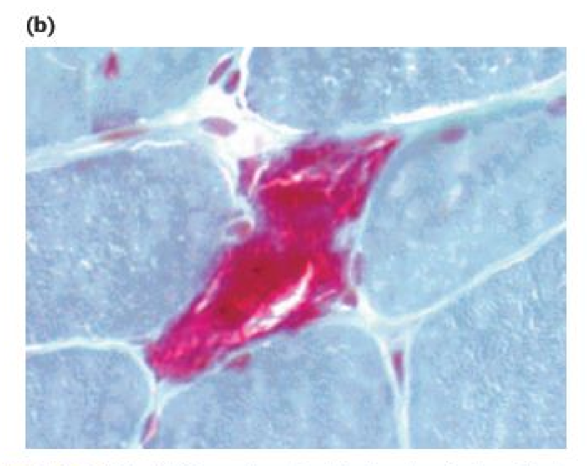


FIGURA 9.9 Miofibrillas rojas deshilachadas de las células de los músculos esqueléticos con una enfermedad mitocondrial. (a) Las fibras musculares tiene poca proliferación. (Véase márgenes rojos y citoplasma moteado.) (b) Proliferación marcada cuando las mitocondrias han reemplazado a muchas estructuras celulares.

que codifican el RNA de transferencia. Concretamente, el gen que codifica al $tRNA^{Lys}$ tiene una transición A-G en su secuencia. Esta alteración interfiere aparentemente con la capacidad de traducción en el orgánulo, que a su vez da lugar a varias de las manifestaciones del trastorno.

Las células de los individuos afectados que presenta heteroplasmia tienen una mezcla de mitocondrias normales y anormales. Pacientes distintos tienen proporciones diferentes de las dos, e incluso tejidos distintos del mismo paciente presentan niveles variados de mitocondrias anormales. Si no hubiera heteroplasmia, la mutación sería probablemente letal, testimoniando la naturaleza esencial de la función mitocondrial y su dependencia de los genes codificados por el mtDNA.

Un segundo trastorno, la **neuropatía ocular hereditaria de Leber (LHON)**, también presenta herencia materna así como lesiones en el mtDNA. Este trastorno se caracteriza por una súbita ceguera bilateral. La edad promedio de la pérdida de visión es a los 27, pero su inicio es muy variable. Se han identificado cuatro mutaciones y todas ellas alteran la fosforilación oxidativa normal. Más del 50 por ciento de los casos se deben a un mutación en una posición específica en el gen mitocondrial que codifica a una subunidad de la NADH deshidrogenasa. Esta mutación se transmite a todos los descendientes a través de la madre. Es interesante advertir que en muchos casos de la LHON, no hay antecedentes familiares; un número significativo de casos parece que se producen por mutaciones «nuevas».

Los individuos gravemente afectados por el tercer trastorno, el **síndrome de Kearns-Sayre (KSS)**, pierden su visión, sufren pérdida de oído y presentan afecciones cardíacas. La base genética del KSS implica deleciones en varios puntos del mtDNA. Muchos pacientes con el KSS no tienen síntomas de niños, pero de adultos manifiestan progresivamente los síntomas. El aumento en la proporción de mtDNA que tiene mutaciones por deleción incrementa la gravedad de los síntomas.

El estudio de los trastornos hereditarios basados en las mitocondrias, proporcionan ideas acerca de la enorme importancia de este orgánulo durante el desarrollo normal, así como de las relaciones entre la función mitocondrial y los trastornos neuromusculares y neurológicos. Tal estudio ha sugerido también una hipótesis sobre el envejecimiento basado en la acumulación progresiva de mutaciones en el mtDNA y la consiguiente perdida de la función mitocondrial.

9.4 La herencia infecciosa se basa en las relaciones simbióticas entre el organismo huésped y el invasor

En los eucariotas abundan numerosos ejemplos de fenotipos que se transmiten a través del citoplasma debido a microorganismos o partículas infecciosas. Los invasores foráneos que coexisten en una relación simbiótica, pasan a través del ooplasma materno a las células u organismos hijos y les confieren un fenotipo específico. Consideraremos varios ejemplos de este fenómeno.

Kappa en *Paramecium*

Tracy Sonneborn fue el primero en describir ciertas cepas de *Paramecium aurelia*, llamadas ***Killers*** (asesinas), debido a que segregan una sustancia citoplásmica llamada **paramecina**, que es tóxica y a veces letal para cepas sensibles. Dicha sustancia la producen las partículas *kappa*, que se replican en el citoplasma de las *killer*; una célula puede tener de 100 a 200 de dichas partículas. Las partículas *kappa* tienen DNA y proteínas y su mantenimiento depende de un gen nuclear dominante, K. Para entender como se transmiten el gen K y las partículas *kappa*, debemos mirar el modo en cómo se reproducen los paramecios.

Los paramecios son protozoos diploides que pueden tener intercambio sexual de información genética mediante conjugación, que se muestra en la Figura 9.10. Cada *Paramecium* tiene un macronúcleo y dos micronúcleos diploides. Al princi-

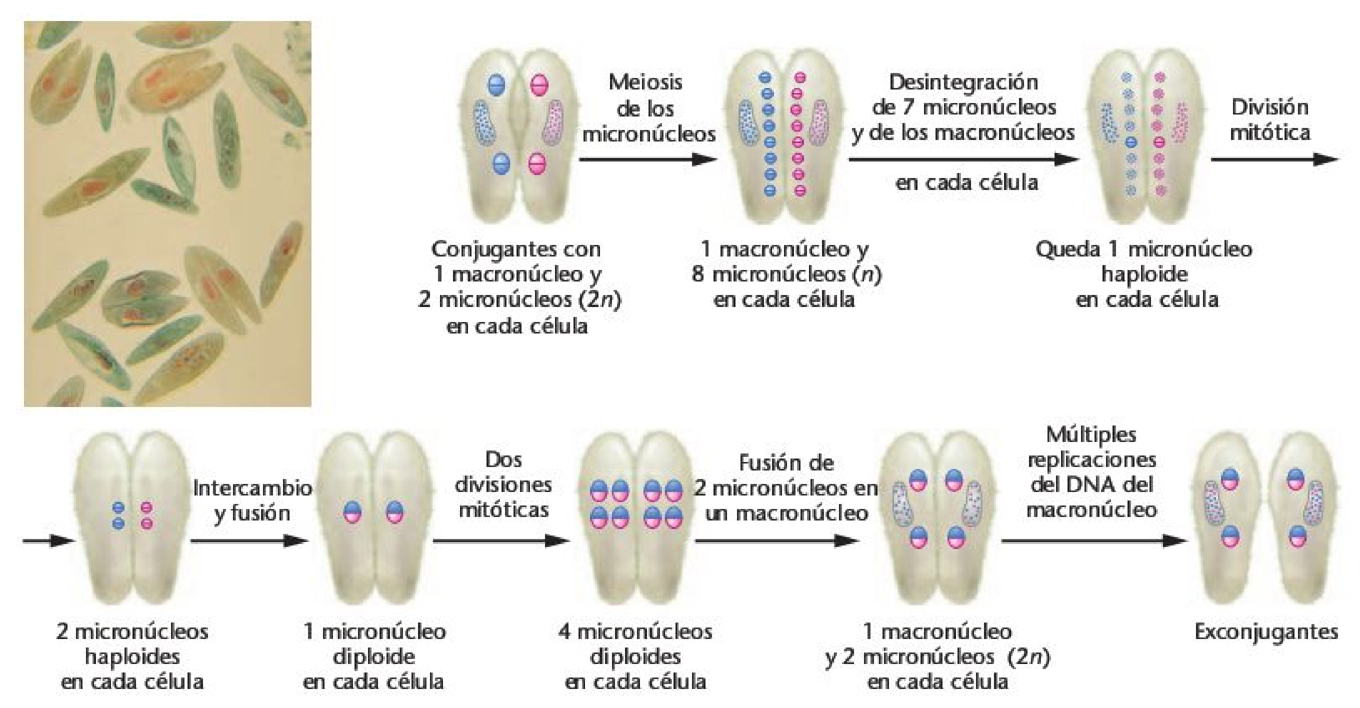


FIGURA 9.10 Procesos durante la conjugación en los *Paramecium*. La fotografía muestra varios pares de organismos en conjugación.

pio de la conjugación, los micronúcleos de cada uno de los apareantes sufren meiosis, dando lugar a ocho micronúcleos haploides. Siete de estos degeneran y el que queda sufre una división mitótica. Entonces, cada célula da uno de los micronúcleos haploides a la otra célula, restaurándose la condición diploide en ambas células. Como consecuencia, los exconjugantes tienen típicamente genotipos idénticos. En algunos casos, la conjugación puede estar acompañada de intercambio citoplásmico.

La **autogamia** es un proceso similar, que implica a una sola célula. Después de la meiosis de ambos micronúcleos, siete productos degeneran y uno sobrevive. Este núcleo se divide y los núcleos resultantes se fusionan para restaurar la condición diploide. Si la célula era heterozigota, la autogamia da lugar a la homozigosis, ya que el núcleo diploide recién formado deriva de un solo producto meiótico haploide. En una población de células originalmente heterozigotas, la mitad de las nuevas células expresarán un alelo y la otra mitad el otro.

La Figura 9.11 ilustra los resultados de los cruces entre células *KK* y *kk*, con y sin intercambio citoplásmico. A veces no se produce intercambio citoplásmico, aun cuando las células resultantes puedan ser *Kk* (o *KK* después de la autogamia). Cuando no ocurre, no se transmiten partículas *kappa* y las células quedan sensibles. Cuando hay intercambio, las células se convierten en *Killer*, siempre y cuando las partículas *kappa* estén apoyadas por al menos un alelo dominante *K*.

Las partículas *kappa* son parecidas a bacterias y pueden contener bacteriófagos atenuados. Una teoría mantiene que estos virus de las partículas *kappa* pueden pasar al estado vegetativo y reproducirse. Durante esta multiplicación, producen los productos tóxicos que son liberados y matan a las cepas sensible.

Partículas infecciosas en *Drosophila*

En *Drosophila* se conocen dos casos de herencia infecciosa, la **sensibilidad al CO_2** y la **proporción de sexos (*sex-ratio*)**. En el primero, las moscas que se recuperarían normalmente cuando se anestesian con anhídrido carbónico, quedan paralizadas de manera permanente y mueren por el CO_2. Las madres sensibles pasan su característica a todos sus descendientes. Además, extractos de moscas sensibles inducen el carácter cuando se inyectan a moscas resistentes. Phillip L'Heritier propuso que la sensibilidad se debe a la presencia de un virus llamado **sigma**. La partícula se ha visualizado con el microscopio electrónico y es más pequeña que la *kappa*. No han tenido éxito los intentos de transferir el virus a otros insectos, demostrando que la presencia de sigma en *Drosophila* está apoyada por genes específicos.

Un segundo caso de partículas infecciosas se ha encontrado en *Drosophila bifasciata*. Un pequeño número de estas moscas tienen descendencia predominantemente femenina si se cultivan a 21 °C o menos. Esta cualidad se transmite a las hijas pero no al pequeño porcentaje de machos que se produce. Posteriormente, este fenómeno se investigó en *Drosophila willistoni*. En estas moscas, la inyección de ooplasma de hembras con *sex-ratio* en el abdomen de hembras normales induce la situación, sugiriendo que un elemento extracromosómico es responsable del fenotipo *sex-ratio*. Se ha aislado el agente responsable, que es un protozoo. Aunque se han encontrado

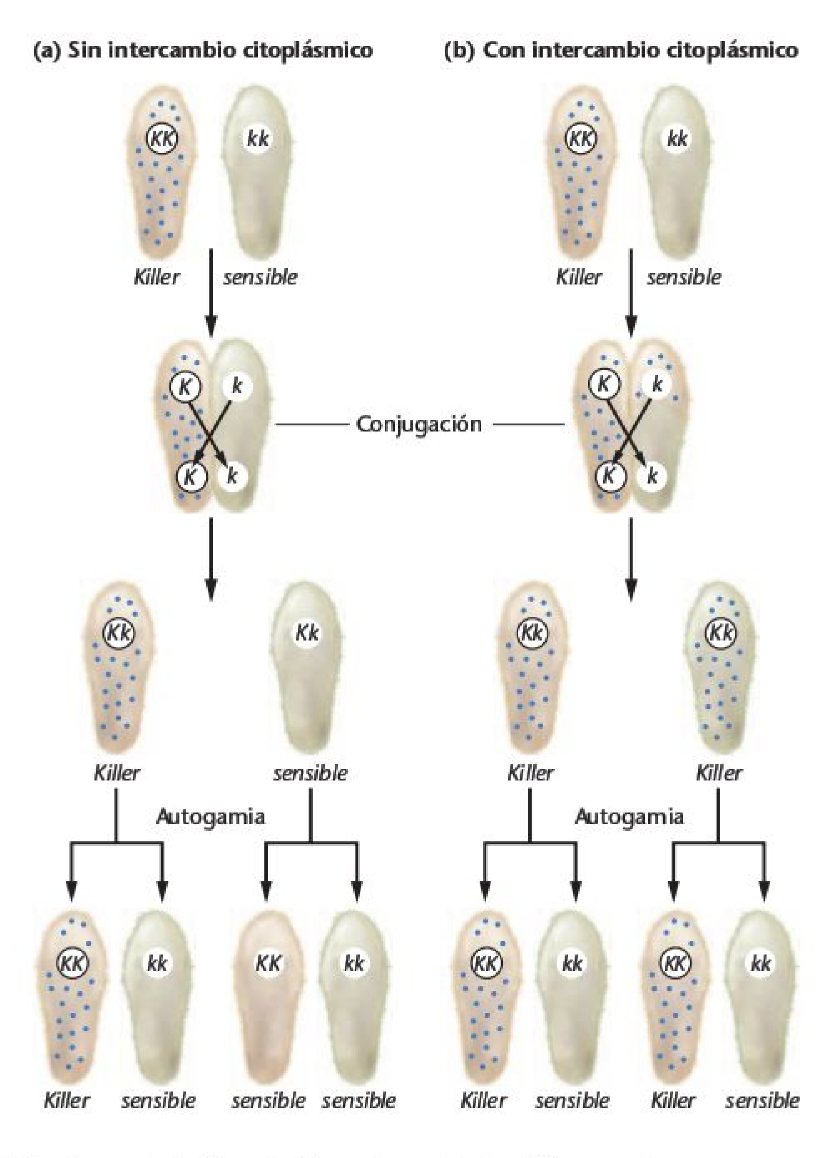


FIGURA 9.11 Resultados de los cruces entre cepas de *Paramecium* Killer (*KK*) y sensibles (*kk*), con y sin intercambio citoplásmico en la conjugación. Las partículas kappa (puntos) se mantienen sólo cuando hay un alelo *K*.

estos protozoos tanto en hembras como en machos, es letal principalmente en el desarrollo de las larvas masculinas. Hay alguna evidencia de que un virus albergado en el protozoo puede ser el responsable de producir una toxina letal para los machos.

9.5 En el efecto materno, el genotipo de la madre tiene gran influencia en el desarrollo temprano

El **efecto materno**, también llamado influencia materna, implica que el fenotipo de un descendiente para un carácter dado está bajo el control de productos génicos nucleares presente en el huevo. Esto contrasta con la herencia biparental, en donde ambos padres transmiten la información de genes nucleares que determinan el fenotipo del descendiente. En los casos de efecto materno, la información genética del gameto de la hembra se transcribe y los productos génicos (proteínas o mRNA aun no traducido) se encuentran en el citoplasma del óvulo. Después de la fecundación, estos productos influyen patrones o caracteres que se establecen durante el desarrollo temprano. Tres ejemplos ilustrarán la influencia del genoma materno sobre caracteres concretos.

La pigmentación en *Ephestia*

Un ejemplo muy directo del efecto materno se observa en la polilla mediterránea de la harina *Ephestia kuehniella* Las larvas de tipo silvestre de esta polilla tienen la cutícula pigmentada y ojos marrones como consecuencia del gen dominan *A*. El pigmento proviene de una molécula precursora, la quinurenina, que a su vez deriva del aminoácido triptófano. Una mutación, *a*, interrumpe la síntesis de quinurenina y, en homozigosis, da lugar a larvas con ojos rojos y poca pigmentación. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 9.12, el resultado del cruce *Aa* × *aa* depende de qué padre lleve el alelo dominante. Cuando el macho es el heterozigoto, entre las larvas se observa una proporción 1:1 para ojos marrones y ojos rojos, tal como predice la segregación mendeliana. Sin embargo, cuando la hembra es

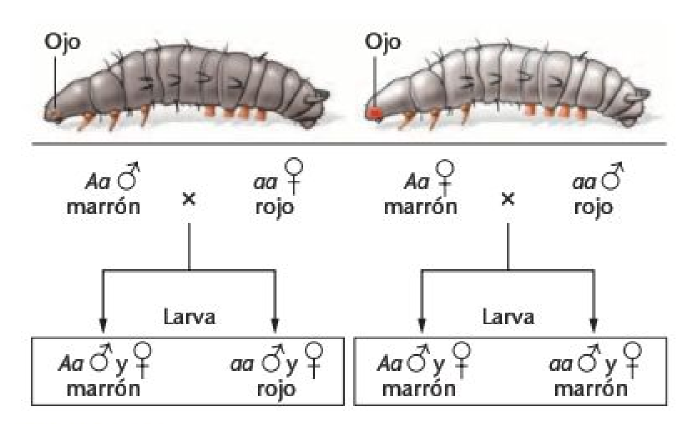


FIGURA 9.12 Influencia materna en la herencia de la pigmentación del ojo en la polilla de la harina *Ephestia kuehniella*. En cada lado de la parte anterior de la larva hay estructuras (ojos) múltiples para la recepción de la luz.

heterozigota, todas las larvas son pigmentadas y tienen ojos marrones, a pesar de que la mitad de ellas son *aa*. A medida que estas larvas llegan a adulto, la mitad desarrolla gradualmente ojos rojos, restableciéndose la proporción 1:1.

Una explicación de estos resultados es que los oocitos *Aa* sintetizan quinurenina o una enzima necesaria para su síntesis, que se acumula en el ooplasma antes de la finalización de la meiosis. Incluso en la descendencia *aa*, cuyas madres eran Aa, este pigmento se distribuye en el citoplasma de las células de la larva en desarrollo; por ello, desarrollan pigmentación y ojos marrones. Finalmente, el pigmento se diluye entre las muchas células y se consume, dando lugar en el adulto a ojos rojos. El ejemplo de *Ephestia* demuestra el efecto materno de un producto génico nuclear almacenado en el citoplasma, que influye en el fenotipo de la larva y, al menos temporalmente, anula el genotipo de la descendencia.

Enrollamiento en *Limnaea*

El enrollamiento de la concha del caracol *Limnaea peregra* es un ejemplo excelente de efecto materno que presenta un fenotipo permanente en lugar de transitorio. Algunas cepas de este caracol tienen el enrollamiento de la concha hacia la izquierda, o levógiro (*dd*), mientras que otras lo tienen hacia la derecha, o dextrógiro (*DD* o *Dd*). Estos caracoles son hermafroditas y pueden presentar fecundación cruzada o autofecundación, permitiendo gran variedad de tipos de apareamiento.

En la Figura 9.13 se ilustran los resultados de los cruces recíprocos entre caracoles de raza pura. Como se puede ver, los cruces producen resultados distintos, aun cuando ambos cruces se den entre organismos dextrógiros y levógiros y producen descendientes que son todos heterozigotos. El examen de la descendencia revela que sus fenotipos dependen del genotipo del caracol donante del óvulo. Si adoptamos dicha conclusión como hipótesis de trabajo, podremos comprobarla examinando los descendientes en generaciones sucesivas de autofecundación. En cada caso la hipótesis se cumple. Los donantes de óvulos que son *DD* o *Dd* producen sólo descendencia enrollada hacia la derecha. Los donantes de óvulos que son *dd* producen sólo descendencia enrollada hacia la izquierda. El patrón de enrollamiento de los descendientes está determinado por el genotipo del padre que produce el óvulo, independientemente del fenotipo de dicho padre.

La investigación del desarrollo en *Limnaea* revela que la orientación del huso en la primera división mitótica, después de la fecundación, determina la dirección del enrollamiento. La orientación del huso parece que está controlada por genes maternos que actúan en el ovario sobre el desarrollo de los óvulos. A su vez, la orientación del huso influye en las divisiones celulares después de la fecundación y establece el patrón de enrollamiento permanente en el adulto. El alelo dextrógiro (*D*) sintetiza un producto génico activo que da lugar al enrollamiento hacia la derecha. Si se inyecta ooplasma de óvulos dextrógiros en óvulos levógiros que no se han dividido, se dividen de acuerdo con un patrón dextrógiro. Sin embargo, en el experimento inverso, el ooplasma levógiro no tiene efecto cuando se inyecta en óvulos dextrógiros. Aparentemente el alelo levógiro es el resultado de una mutación recesiva clásica que codifica un producto génico inactivo.

Entonces, podemos concluir que los caracoles que son *DD* o *Dd* producen oocitos que sintetizan el producto *D*, que se almacena en el ooplasma. Aunque después de la meiosis el oocito tenga sólo el alelo *d* y sea fecundado por un esperma *d*, el caracol resultante *dd* tendrá enrollamiento hacia la derecha.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuáles son las observaciones clave en los cruces entre caracoles dextrógiros y levógiros que apoyan la explicación de que este fenotipo es el resultado de herencia de «efecto materno».

Desarrollo embrionario en *Drosophila*

Un ejemplo documentado mas reciente de efecto materno implica a varios genes que controlan el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. El control genético del desarrollo embrionario de *Drosophila*, discutido con mayor detalle en el Capítulo 23, es una historia fascinante. Los productos proteicos de genes de efecto materno funcionan activando a otros genes, que a su vez activan a otros genes. Esta cascada de actividad génica da lugar a un embrión normal, que posteriormente se desarrolla produciendo una mosca adulta normal. El enorme trabajo de Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus (que compartieron en 1995 el premio Nobel de Fisiología o Medicina por sus descubrimientos) ha clarificado como funcionan estos y otros genes. Los genes que ilustran el efecto materno tienen productos que se sintetizan en el óvulo en desarrollo y se almacenan en el oocito antes de la fecundación. Después de la fecundación, estos productos espe-

FIGURA 9.13 Herencia del enrollamiento del caracol *Limnaea peregra*. El enrollamiento es dextrógiro (hacia la derecha) o levógiro (hacia la izquierda) El efecto materno es evidente en las generaciones II y III, en donde el genotipo de la madre, en lugar del propio genotipo de los descendientes, condiciona el fenotipo de estos. La fotografía ilustra una mezcla de caracoles enrollados hacia la derecha o hacia la izquierda.

cifican gradientes moleculares que determinan la organización espacial a medida que prosigue el desarrollo.

Por ejemplo, el gen *bicoid* (*bcd*) juega un papel importante especificando el desarrollo de la parte anterior de la mosca. Los embriones que se derivan de madres que son homozigotas para esta mutación (bcd^-/bcd^-) no desarrollan la parte anterior que normalmente da lugar a la cabeza y al tórax en la mosca adulta. Los embriones cuyas madres tienen al menos un alelo silvestre (bcd^+) se desarrollan normalmente, aun cuando el genotipo del embrión sea homozigoto para la mutación. De acuerdo con el concepto del *efecto materno*, es el *genotipo de la madre* y no el *genotipo del embrión* quien determina el fenotipo del descendiente.

Cuando volvamos a la discusión de este tema en el Capítulo 23, veremos ejemplos de otros genes que ilustran el efecto materno, así como muchos genes «zigóticos» cuya expresión se produce en el desarrollo temprano y que se comportan genéticamente de la forma mendeliana convencional.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

DNA mitocondrial y el misterio de los Romanov

Según algunos, Nicolás II, el último Zar de Rusia, fue un monarca por debajo de lo normal. Fue acusado de torpe durante la guerra Ruso-Japonesa de 1904-1905, y su régimen estaba plagado de corrupción e incompetencia. Aun así, probablemente no mereció el destino que tuvo él y su familia una noche de verano de 1918. Como veremos, la comprensión completa de este hecho depende, por encima de todo, del DNA mitocondrial.

Después de haber sido forzado a abdicar en 1917, finalizando los 300 años de reinado de los Romanov, el Zar Nicolás y la familia imperial fueron desterrados a Ekaterimburgo, en el oeste de Siberia. Allí, se creía, estarían fuera del alcance de los feroces Bolcheviques antiimperialistas, que estaban luchando para obtener el control del país. Pero los Bolcheviques capturaron finalmente a los Romanov. En una noche de Julio de 1918, el Zar Nicolás, la Zarina Alejandra (nieta de la Reina Victoria), sus cinco hijos (Olga, 22; Tatiana, 21; Maria, 19; Anastasia, 17 y Alexei, 13), el médico de la familia y tres de sus sirvientes, fueron despertados y llevados a una habitación del piso inferior de la casa en donde se les mantuvo prisioneros. Se les pidió que formaran una fila doble contra la pared, probablemente para que se les pudiera fotografiar. En vez de ello, prorrumpieron en el cuarto 11 hombres con revólveres y abrieron fuego. Después de agotar su munición, hundieron sus bayonetas en los cuerpos y destrozaron sus rostros con las culatas de los rifles. Luego, llevaron los cadáveres en carro y los arrojaron en el pozo de una mina y sólo dos días mas tarde los sacaron y los descargaron en una fosa poco profunda, los rociaron con ácido sulfúrico y los enterraron. Allí estuvieron durante más de 60 años.

Muy pronto, el asesinato de los Romanov se rodeó de un aire de misterio. ¿Murieron todos los hijos de Nicolás y Alejandra con sus padres aquella noche sangrienta o se salvó la hija mas joven, Anastasia? Durante años, la posibilidad de que Anastasia escapara milagrosamente de la ejecución ha inspirado incontables libros, una película de Hollywood, un ballet, una obra de teatro de Broadway y, más recientemente, una película de dibujos animados. En todas estas nuevas versiones, Anastasia reaparece reclamando su derecho como el único miembro sobreviviente de los Romanov. Al misterio se añadió una tal Anna Anderson. Dos años después de ser recuperada de un canal de Berlín después de un intento de suicidio en 1920, comenzó a pretender que era la gran duquesa Anastasia. A pesar de su historial de desequilibrio mental y de una curiosa incapacidad para hablar ruso, logró convencer a muchas personas.

El misterio comenzó a desenredarse en 1979, cuando un geólogo siberiano y un director de cine moscovita descubrieron cuatro cráneos que creyeron pertenecían a la familia del Zar. No fue hasta el verano de 1991, después de la «glasnost», que comenzó la exhumación. En conjunto, se recuperaron casi 1.000 fragmentos de huesos, que sirvieron para reconstruir nueve esqueletos, cinco de mujeres y cuatro de hombres. Basándose en la medida de los huesos y superponiendo los cráneos en fotografías con ayuda informática, se identificaron los restos como pertenecientes posiblemente a los Romanov asesinados. Pero todavía faltaban dos cuerpos, uno de las hijas (que se creía podría ser de Anastasia) y del joven Alexei.

El siguiente paso para autentificar los restos implicaba estudios de DNA, llevados a cabo por Pavel Ivanov, el líder de los forenses rusos, analista de DNA, en colaboración con Peter Gill, del Servicio Científico Forense Británico. Su objetivo fue establecer las relaciones familiares entre los restos, y luego determinar, en comparación con parientes vivos, si el grupo familiar era de hecho de los Romanov. Congelaron los fragmentos de los huesos de los nueve esqueletos en nitrógeno líquido, los trituraron en un polvo fino y extrajeron pequeñas cantidades de DNA, que comprendía tanto DNA nuclear como mitocondrial (mtDNA). El análisis genómico del DNA de cada esqueleto confirmó las relaciones familiares y demostró que, realmente, faltaba una de las princesas y Alexei. Ahora, la prueba final de que los huesos pertenecían a los Romanov esperó al análisis del mtDNA.

El DNA mitocondrial es ideal para estudios forenses por varias razones. Primero, ya que todas las mitocondrias de las células humanas derivan de las mitocondrias presentes en el óvulo, el mtDNA se transmite estrictamente de la madre a los descendientes, nunca del padre a los descendientes. Por ello, las secuencias del mtDNA se pueden utilizar para seguir la línea materna, sin los efectos complicados del entrecruzamiento en la meiosis, que recombina los genes nucleares maternos y paternos en cada generación. Además, el mtDNA es pequeño (16.600 pares de bases) y hay entre 500 y 1.000 copias por célula, por lo que es mucho mas fácil recuperarlo intacto que el DNA nuclear.

El grupo de Ivanov amplificó dos regiones muy variables del mtDNA aislado de las nueve muestras de huesos y determinó la secuencia de nucleótidos de dichas regiones. Comparando estas secuencias con los parientes vivos de los Romanov, esperaban establecer la identidad de los restos de Ekaterimburgo una vez por todas. Las secuencias de la Zarina Alejandra encajaban perfectamente con las del príncipe Felipe de Edimburgo, que es su sobrino nieto, verificando su identidad. Sin embargo, la autentificación del Zar fue más complicada.

Las secuencias del Zar se compararon con las de los dos únicos parientes vivos a los que se pudo persuadir que participaran en el estudio, el Conde Xenia Cheremeteff-Sfiri (su sobrino biznieto) y de James George Alexander Bannerman Carnegie, tercer duque de Fife (un pariente mas alejado, descendiente de mujeres estrechamente relacionadas con la abuela del Zar). Estas comparaciones dieron una sorpresa. En la posición 16.169 del mtDNA del Zar parecía que había o la base C o la T. No obstante, el conde y el duque tenían sólo T. La conclusión fue que el Zar Nicolás tenía en sus células dos poblaciones distintas de mitocondrias, cada una con una base distinta en la posición 16.169 de su mtDNA. Esta situación, llamada heteroplasmia, se cree que se produce en el 10 al 20 por ciento de los humanos.

La ambigüedad entre el supuesto Zar y sus dos parientes maternos vivos arrojo dudas sobre la identificación de los restos.

Afortunadamente, el gobierno ruso aprobó la petición de analizar los restos del hermano mas joven del Zar, el gran duque Georgij Romanov, que murió en 1899 de tuberculosis. Se encontró que el mtDNA del gran duque tenía la misma variante heteroplámica en la posición 16.169, con C o con T. Se concluyó que los huesos de Ekaterimburgo eran de la familia imperial asesinada. Con años de controversia resueltos finalmente, los restos autentificados del Zar Nicolás II, la Zarina Alejandra y tres de sus hijas fueron enterrados en la Catedral de San Pedro y San Pablo de San Petersburgo el 17 de Julio de 1998, 80 años después del día en que fueron asesinados.

Sin embargo, este análisis del DNA no resolvió el misterio del destino de Anastasia. ¿Murió ella con sus padres, hermanas y hermano en 1918? ¿O es posible que Anna Anderson dijera la verdad y que ella fuera la duquesa escapada? En un estudio distinto, se recuperó el DNA nuclear y el mtDNA de tejido intestinal de Ana Anderson, conservado de una operación realizada cinco años antes de su muerte en 1984. Los análisis de este DNA confirmaron que ella no era Anastasia, sino una campesina polaca llamada Francisca Schanzkowska.

Si los restos de Anastasia no se encontraron entre los de sus padres y hermanas y si Anna Anderson era una impostora, ¿qué le sucedió a Anastasia? Muchas evidencias sugieren que Anastasia y su hermano Alexei no se encontraron con los otros en la fosa común debido a que sus cuerpos fueron quemados sobre la tumba dos días después de los asesinatos y sus cenizas, esparcidas, nunca se encontraran. No exactamente como un final de Hollywood.

Referencias

Gibbons, A. 1998. Calibrating the mitochondrial clock. *Science* 279:28-29.

Ivanov, P. et al. 1996. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet*. 12:417-20.

Masse, R. 1996. *The Romanovs: The final chapter.* New York: Ballantine Books.

Stoneking, M. et al. 1995. Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nat. Genet.* 9:9.10.

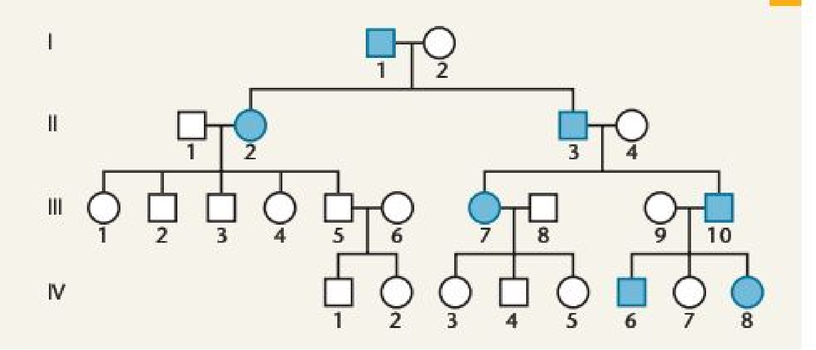
RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Los patrones de herencia a veces varían de lo esperado de una transmisión biparental de genes nucleares. En tales casos, parece a menudo que los fenotipos son el resultado de la información genética transmitida a través del óvulo.
2. La herencia de los orgánulos se basa en los genotipos de DNA de los cloroplastos y mitocondrias que estos orgánulos transmiten a sus descendientes. Las mutaciones en los cloroplastos afectan a la capacidad fotosintética de los vegetales, mientras que las mutaciones mitocondriales afectan a la gran dependencia de las células por el ATP generado en la respiración celular. Los mutantes resultantes presentan fenotipos relacionados con la pérdida de función de estos orgánulos.
3. Tanto los cloroplastos como las mitocondrias se originaron en las células eucariotas hace unos 2.000 millones de años, cuando fueron invadidas por protobacterias. En la evolución, muchos de los genes de la bacteria se transfirieron al núcleo de la célula y se desarrolló una relación simbiótica en la que estos orgánulos aumentaron la capacidad energética de la célula. Las pruebas en apoyo de esta hipótesis endosimbiótica son numerosas y se centran en muchas observaciones sobre el DNA y la maquinaria genética presente actualmente en cloroplastos y mitocondrias.
4. Otra forma de herencia extranuclear es atribuible a la transmisión de microorganismos infecciosos. Son ejemplos, las partículas kappa, la sensibilidad al CO_2 y la determinación de la proporción de sexos.
5. Los patrones de efecto materno se producen cuando los productos de genes nucleares controlados por el genotipo de la madre influyen en el desarrollo temprano del óvulo. Son ejemplos, la pigmentación en *Ephestia*, el enrollamiento de la concha de los caracoles y la expresión génica durante el desarrollo temprano de *Drosophila*.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Analice la siguiente genealogía hipotética y proporcione la interpretación más consistente de cómo se hereda el carácter y de cualquier discordancia.

Solución: El carácter se transmite desde todos los varones afectados a todos sus descendientes menos uno, siendo la única excepción el individuo IV-7 (una mujer), pero *nunca* lo transmiten las mujeres.



2. ¿Se puede explicar la genealogía anterior por un gen situado en el cromosoma Y? Razone su respuesta.

Solución: No, ya que los varones transmiten el carácter a sus hijas lo mismo que a sus hijos.

3. El caso anterior, ¿es un caso de efecto o herencia paterna?

Solución: Tiene todas las características de herencia paterna, ya que los varones transmiten el carácter a casi todos sus descendientes. Para comprobar si el carácter se debe a un efecto paterno (consecuencia de un gen nuclear en los gametos masculinos), sería necesario analizar otros cruces.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

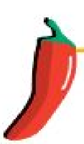
1. ¿Qué criterios genéticos distinguen un caso de herencia extranuclear de un caso de herencia autonómica mendeliana? ¿Y de un caso de herencia ligada al X?
2. La resistencia a la estreptomicina en *Chlamydomonas* puede ser el resultado de una mutación en un gen cloroplástico o en un gen nuclear. ¿Qué resultados fenotípicos se producirían en un cruce entre un miembro de una cepa resistente mt^+ por ambos tipos de genes y un miembro de una cepa sensible al antibiótico? ¿Qué resultados se esperarían en el cruce recíproco?
3. Una planta puede tener en sus ramas hojas verdes, blancas o verdes y blancas (variegadas), debido a una mutación en los cloroplastos que evita que se desarrolle el color. Prediga los resultados de los siguientes cruces:

	Origen del óvulo		Origen del polen
(a)	Rama verde	×	Rama blanca
(b)	Rama blanca	×	Rama verde
(c)	Rama variegada	×	Rama verde
(d)	Rama verde	×	Rama variegada

4. Se aísla un mutante *petite* de un cultivo aeróbico de levadura. Para determinar el tipo de mutación responsable de este fenotipo se hizo un cruce entre la cepa *petite* y una cepa de tipo silvestre. A continuación se muestran tres resultados posibles de tal cruce. Para cada serie de resultados, qué conclusiones son justificadas acerca del tipo de mutación *petite*?
   (a) todas de tipo silvestre
   (b) algunas *petite*, otras de tipo silvestre
   (c) todas *petite*
5. En cepas de levadura diploides, la esporulación y posterior meiosis puede dar lugar a ascosporas haploides, que se pueden fusionar para restablecer células diploides. Cuando las ascosporas de una cepa *petite segregacional* se fusionan con las de una cepa silvestre, todos los zigotos diploides son normales. Después de la meiosis las ascosporas son *petite* y normales. El fenotipo *petite segregacional* ¿se hereda como un carácter dominante o recesivo?
6. Prediga los resultados de un cruce entre ascosporas de una cepa *petite segregacional* y una cepa *petite neutral*. Indique el fenotipo del zigoto y de las ascosporas que se pueden producir.
7. A continuación se dan los resultados de tres cruces entre cepas de *Paramecium*:

(a)	Killer × sensible	⟶	1/2 Killer:1/2 sensible
(b)	Killer × sensible	⟶	todas Killer
(c)	Killer × sensible	⟶	3/4 Killer:1/4 sensible

   Determine los genotipos de las cepas paternas.
8. *Chlamydomonas*, un alga verde eucariota, es sensible al antibiótico eritromicina, que inhibe la síntesis proteica en procariotas.
   (a) Explique por qué.
   (b) En esta alga hay dos tipos de apareamiento, mt^+ y mt^-. Si una célula mt^+ sensible al antibiótico se cruza con una célula mt^- resistente, todas las células hijas son sensibles. El cruce recíproco (mt^+ resistente y mt^- sensible) da lugar a todas las células hijas resistentes. Suponiendo que la mutación para la resistencia esté en el DNA cloroplástico, ¿qué se puede concluir de los resultados de estos cruces?
9. En *Limnaea*, ¿qué resultados se esperarían en un cruce entre un caracol de enrollamiento dextrógiro *Dd* y otro de enrollamiento levógiro *Dd*, suponiendo que se produce fecundación cruzada, como se muestra en la Figura 9.13? ¿Qué resultados se obtendrían si el caracol dextrógiro *Dd* produjera sólo óvulos y el levógiro *Dd* produjera sólo esperma?
10. En un cruce de *Limnaea*, el caracol que contribuyó con los óvulos era dextrógiro, pero de genotipo desconocido. Se desconocía el fenotipo y el genotipo del otro caracol. Todos los descendientes de F_1 presentaban enrollamiento dextrógiro. Se permitió que diez caracoles de F_1 se autofecundaran. La mitad produjeron sólo descendientes dextrógiros, mientras que la otra mitad produjo sólo descendientes levógiros. ¿Cuáles eran los genotipos de los padres?
11. En *Drosophila subobscura*, la presencia de un gen recesivo llamado *grandchildless (gs)* (sin nietos) da lugar a que los descendientes de hembras homozigotas, pero no de machos homozigotos, sean estériles. ¿Puede proponer una explicación de por qué las hembras y no los machos, están afectados por el gen mutante?
12. Un macho de ratón de una cepa de raza pura de animales hiperactivos se cruzó con una hembra de una cepa de raza pura de animales apáticos (estas dos cepas son hipotéticas). Toda la descendencia fue apática. En F_2 toda la descendencia fue apática. ¿Cuál es la mejor explicación genética para estos datos? Proponga un cruce para comprobar su explicación.
13. En la especie humana, el DNA mitocondrial codifica para 22 moléculas de RNA de transferencia (tRNA) diferentes. Sin embargo, la mitocondria necesita 32 moléculas de tRNA distintas para la traducción de las proteínas. ¿Cómo es posible?
14. Considere el caso en donde una mutación desbarata la traducción en una única mitocondria humana que se encuentra en el oocito que participa en la fecundación. ¿Cuál es el posible impacto de esta mutación en la descendencia que surgirá de este oocito?



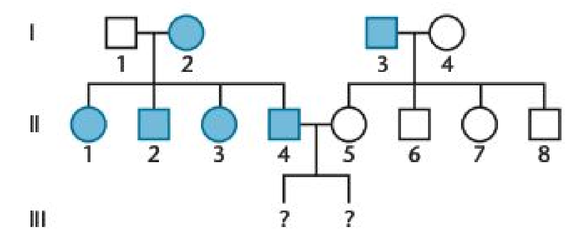
Problemas extra-picantes

15. La especificación del eje antero-posterior de los embriones de *Drosophila* está controlado inicialmente por varios productos génicos que se sintetizan y se almacenan durante la oogénesis en el óvulo maduro. La mutación de estos genes da lugar a anormalidades en el eje durante la embriogénesis. Estas mutaciones son un ejemplo de *efecto materno*. ¿De qué manera estas mutaciones son diferentes de las que implican herencia de orgánulos que ilustran la *herencia citoplásmica*? Diseñe una serie de cruces en paralelo y los resultados esperados que impliquen a genes mutantes para contrastar efecto materno y herencia citoplásmica.

16. La mutación de efecto materno *bicoid (bcd)* es recesiva. En ausencia del producto proteico bicoid, no se completa la embriogénesis. Considere un cruce entre una hembra heterozigota para bicoid (bcd^+/bcd^-) y un macho homozigoto para la mutación (bcd^-/bcd^-).

(a) ¿Cómo es posible que exista un macho homozigoto para la mutación?
(b) Prediga el resultado (embriogénesis normal respecto de abortada) en las generaciones F_1 y F_2 del cruce anterior.

17. A continuación se muestra una genealogía de un hipotético trastorno en la especie humana:



Analice la genealogía y proponga una explicación genética de la naturaleza del trastorno. De acuerdo con su explicación, prediga el resultado de un cruce entre los individuos II-4 y II-5.

18. Hacia finales de la década de 1950, Yuichiro Hiraizumi, un becario postdoctoral de la Universidad de Wisconsin, cruzó una cepa de laboratorio de *Drosophila melanogaster*, que era homozigota para las mutaciones recesivas del segundo cromosoma *cinnabar (cn)* y *brown (bw)* con una cepa de tipo silvestre capturada en Madison, Wisconsin (Hiraizumi, Y. 1959. *Genetics* 44:232-50). La cepa de laboratorio tenía ojos blancos, mientras que la cepa silvestre tenía ojos rojos, que posteriormente se denominó *SD*. La descendencia resultante, al ser heterozigota para *cn* y *bw*, tenía ojos rojos. Cuando Hiraizumi retrocruzó hembras F_1 con machos *cn bw/cn bw*, el 50 por ciento de los descendientes tenían ojos blancos, tal como se esperaba. Sin embargo, cuando se realizo el retrocruce recíproco (macho F_1 con hembras *cn bw/cn bw*), menos del 2 por ciento de las moscas tenían ojos blancos.

(a) Proponga una explicación consistente con estos resultados.
(b) Diseñe un experimento para comprobar su hipótesis.
(c) *SD* se refiere a «segregación distorsionada», ¿cuál es su significado?

19. Los caracteres que se heredan extracromosómicamente están muy extendidos en los artrópodos. En la mariquita *Adalia bipunctata*, se descubrió un carácter letal para los machos, de tal manera que ciertas cepas de hembras presentan una proporción de sexos distorsionada que favorece a la descendencia femenina (Werren, J., et al. 1994. *J. Bacteriol.* 176:388-94). Cepas no afectadas muestra una proporción de sexos normal uno:uno. Dos observaciones importantes son que las cepas afectadas se pueden curar con antibióticos y que además de sus rRNA normales de 18S y 28S, se puede detectar por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un rRNA de 16S. De los tipos de herencia extranuclear descritos en el texto (herencia de orgánulos, herencia infecciosa y efecto materno), ¿cuál es el mas probable que da lugar a la proporción de sexos alterada en *Adalia*?

20. El gen *abnormal oocyte (abo)* de *Drosophila melanogaster* da lugar a un efecto materno recesivo que reduce la viabilidad de los descendientes. En general, la letalidad se produce en la embriogénesis tardía, sin embargo algunas larvas salen del huevo. Es interesante que la manipulación genética del conjunto de genes de las histonas del genoma de la madre altere la gravedad del efecto materno *abo*, como se muestra en la siguiente tabla (Berloco, M., et al. 2001. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98:12126-31).

Influencia de las deficiencias en el grupo de genes de las histonas sobre el efecto materno *abo*

Genotipo materno		N.º de huevos	Descendencia	Supervivencia (adultos/huevos)	Supervivencia relativa (E/C)
Df(2L)DS5, abo/abo	(E)	2.905	969	0,33	
Df(2L)DS5, abo/+	(C)	2.895	2.400	0,83	0,40
Df(2L)DS6, abo/abo	(E)	1.988	626	0,32	
Df(2L)DS6, abo/+	(C)	2.000	1.565	0,78	0,41
Df(2L)DS9, abo/abo	(E)	3.450	570	0,17	
Df(2L)DS9, abo/+	(C)	3.300	2.970	0,90	0,19

Df(2)DS5 y *Df(2)DS6* son deficiencias de histonas; *Df(2)DS9* no afecta a los genes de las histonas.
(E) = experimental; (C) = control

Analice la información de la tabla anterior y deduzca todas las conclusiones posibles en relación con el efecto materno de *abo* y el papel del gen *abo* de tipo silvestre.

LECTURAS SELECCIONADAS

Adams, KL., et al. 2000. Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature* 408:354-57.

Choman, A. 1998. The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am. J. Hum. Genet.* 62:745-51.

Freeman, G., and Lundelius, J.W. 1982. The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Lymnaea peregra. Wilhelm Roux Arch.* 191:69-83.

Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-81.

Green, B.R., and Burton, H. 1970. Acetabularia chloroplast DNA: Electron microscopic visualization. *Science* 168:981-82.

Grivell, L.A. 1983. Mitochondrial DNA. *Sci. Am.* (Mar.) 248:78-89.

Larson, N.G., and Clayton, D.A. 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Ann. Rev. Genet.* 29:151-78.

Margulis, L. 1970. *Origin of eukaryotic cells.* New Haven, CT: Yale University Press.

Mitchell, M.B., and Mitchell, H.K. 1952. A case of maternal inheritance in *Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:442-49.

Nüsslein-Volhard, C. 1996. Gradients that organize embryo development. *Sci. Am.* (Aug.) 275:54-61.

Preer, J.R. 1971. Extrachromosomal inheritance: Hereditary symbionts, mitochondria, chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* 5:361-406.

Sager, R. 1965. Genes outside the chromosomes. *Sci. Am.* (Jan.) 212:70-79.

______ 1985. Chloroplast genetics. *BioEssays* 3:180-84.

Schwartz, R.M., and Dayhoff, M.O. 1978. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts. *Science* 199:395-403.

Sonneborn, T.M. 1959. Kappa and related particles in *Paramecium. Adv. Virus Res.* 6:229-56.

Sturtevant, A.H. 1923. Inheritance of the direction of coiling in *Limnaea. Science* 58:269-70.

Wallace, D.C. 1997. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* Aug. 277:40-59.

______ 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-88.

Estructura y análisis del DNA

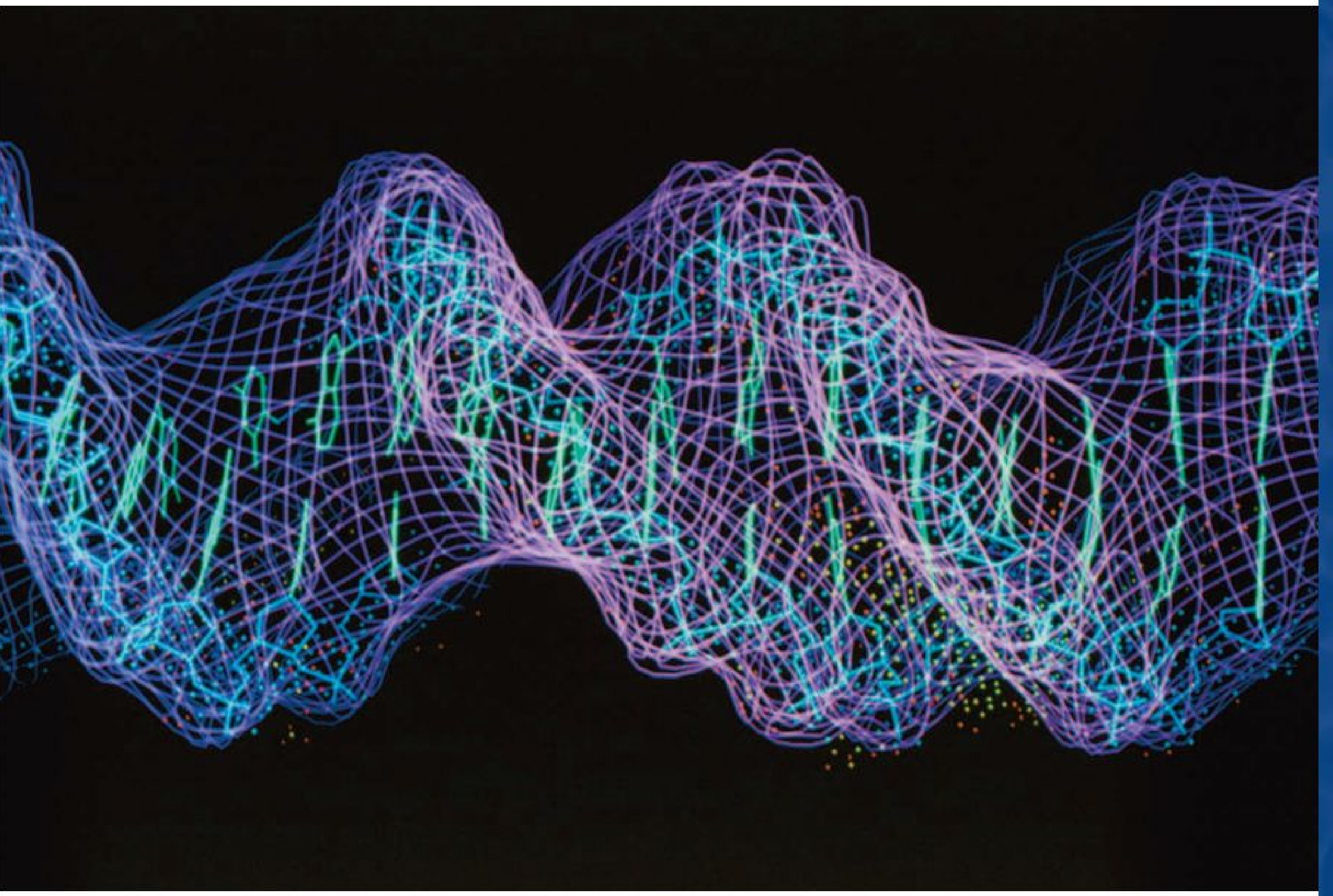


Imagen computerizada del DNA.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- Salvo la excepción de algunos virus, el DNA es el material genético de todos los seres vivos de la Tierra.
- Según el modelo de Watson y Crick, el DNA se presenta con la forma de una doble hélice enrollada hacia la derecha.
- Las cadenas de la doble hélice se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno entre pares de bases nitrogenadas complementarias.
- La estructura del DNA proporciona la base para almacenar y expresar la información genética.
- El RNA tiene muchas semejanzas con el DNA, pero se presenta en forma de cadena sencilla.
- En algunos virus, el RNA es utilizado como material genético.

Al principio del libro tratamos la existencia de genes en los cromosomas que controlan las características fenotípicas así como la manera en que los cromosomas se transmiten a los descendientes a través de los gametos. Por lógica, los genes deben contener algún tipo de información que, una vez pasada a una nueva generación, influye en la forma y en las características de los descendientes; esta información recibe el nombre de **información genética**. También podríamos concluir que esta misma información debe dirigir de alguna manera los complejos procesos que conducen a la forma adulta.

Hasta 1944, no quedó claro qué componente químico de los cromosomas formaba los genes y constituía el material genético. Puesto que se sabía que los cromosomas estaban formados por ácidos nucleicos y proteínas, ambos componentes se consideraban candidatos. Sin embargo, en 1944 surgieron pruebas experimentales directas de que los ácidos nucleicos, en concreto el DNA, eran los que servían de base a la información en el proceso de la herencia.

Una vez reconocida la importancia del DNA en los procesos genéticos, se intensificó la investigación para conocer tanto la base estructural de esta molécula como la relación entre su estructura y su función. Entre 1944 y 1953, muchos científicos buscaron información que pudiera responder a una de las preguntas más intrigantes de la historia de la biología: ¿cómo puede servir el DNA de base genética para los procesos de la vida? Dadas las complejas pero ordenadas funciones adscritas a la molécula de DNA, se creía que la respuesta dependería de su estructura química.

Estos esfuerzos se vieron recompensados en 1953 cuando James Watson y Francis Crick expusieron su hipótesis sobre la naturaleza de doble hélice del DNA. La suposición de que las funciones de la molécula se clarificarían más fácilmente tras determinar su estructura general fue correcta. Este capítulo repasa inicialmente las pruebas de que el DNA es el material genético y luego se discute la interpretación de su estructura.

10.1 El material genético debe presentar cuatro características

Para que una molécula atienda a la función de material genético debe poseer cuatro características principales: **replicación, almacenaje de la información, expresión de esta información** y **variación por mutación**. La replicación del material genético es una de las facetas del ciclo celular, una propiedad fundamental de todos los organismos vivos. Una vez el material genético de las células se ha replicado, se debe repartir equitativamente en las células hijas. En la formación de los gametos, el material genético también se replica, pero se reparte de manera que cada célula recibe solo la mitad de la cantidad original de material genético. Este proceso recibe el nombre de *meiosis*, y se trató en el Capítulo 2. Aunque los productos de la mitosis y de la meiosis son diferentes, ambos procesos forman parte del fenómeno general de la reproducción celular.

La característica de almacenaje debe verse como un repertorio de información genética, tanto si se expresa como si no. Está claro que, aunque la mayoría de las células contienen un juego completo de DNA, en cualquier momento dado expresan sólo una parte de su potencial genético. Por ejemplo, las bacterias «activan» muchos genes en respuesta a condiciones ambientales específicas, y los desactivan cuando esas condiciones cambian. En los vertebrados, las células epiteliales pueden tener los genes de la melanina activos pero nunca activan los de la hemoglobina; las células digestivas activan muchos genes específicos para su función, pero no activan los de la melanina.

La necesidad de que el material genético tenga que codificar la casi infinita variedad de productos génicos que se encuentran en las innumerables formas de vida presentes en nuestro planeta es inherente al concepto de almacenaje. El lenguaje químico del material genético debe ser capaz de realizar esta tarea ya que éste almacena información que se transmite a las células y organismos descendientes.

La expresión de la información genética almacenada es un proceso complejo y la base para el concepto de **flujo de información** en la célula. La Figura 10.1 muestra un esquema simplificado de este concepto. El suceso inicial es la transcripción del DNA, cuyo resultado es la síntesis de tres tipos de moléculas de RNA: **RNA mensajero (mRNA)**, **RNA transferente (tRNA)** y **RNA ribosómico (rRNA)**. De ellos, los mRNA se traducen en proteínas. Cada tipo de mRNA es el producto de un gen específico y dirige la síntesis de una proteína diferente. La **traducción** se realiza en unión con los ribosomas, que contienen rRNA, y en ella participa también el tRNA, que

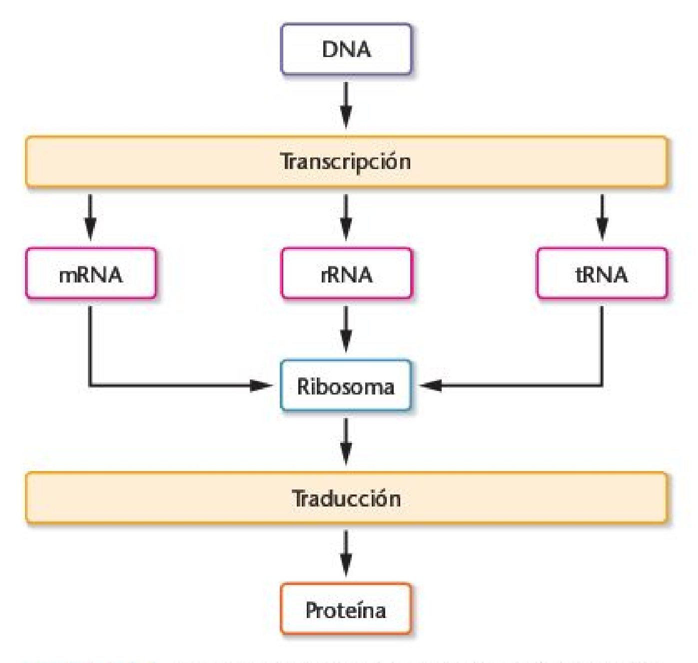


FIGURA 10.1 Esquema simplificado del flujo de información en el interior de las células en el que participan DNA, RNA y proteínas.

actúa como adaptador para convertir la información química del mRNA en los aminoácidos que forman las proteínas. En conjunto, estos procesos sirven de base para el **dogma central de la genética molecular**: *el DNA fabrica el RNA, y éste a su vez produce las proteínas.*

El material genético también debe ser la base de nueva variabilidad para los organismos por el proceso de mutación. Si ocurre una mutación —un cambio en la composición química del DNA—, la alteración se reflejará en la transcripción y en la traducción, afectando a menudo a la proteína especificada. Si una mutación está presente en los gametos, ésta pasará a las futuras generaciones y, con el tiempo, puede extenderse a la población. La variación genética, que a menudo incluye reordenaciones dentro y entre cromosomas (como se trató en el Capítulo 8), proporciona la materia prima para el proceso de la evolución.

10.2 Hasta 1944 las observaciones favorecían a las proteínas como material genético

La idea de que el material genético se transmite de manera física de los progenitores a sus descendientes fue aceptada desde los inicios del concepto de herencia. La investigación de la estructura de las biomoléculas, que se inició a finales del siglo XIX, progresó considerablemente, sentando las bases para la descripción del material genético en términos químicos. Aunque tanto las proteínas como los ácidos nucleicos se consideraban como los mejores candidatos para desempeñar la función de material genético, hasta la década de 1940 muchos genéticos se inclinaban por las proteínas. Tres factores contribuyeron a esta creencia.

Primero, las proteínas son abundantes en las células. Aunque el contenido en proteínas puede variar considerablemente, más del 50 por ciento del peso celular seco pertenece a estas moléculas. Puesto que las células tienen tal cantidad y variedad de proteínas, no es de extrañar que los primeros genéticos creyeran que algunas de estas proteínas pudiesen tener la función de material genético. El segundo factor fue la propuesta aceptada a principios y mediados del siglo XX sobre la estructura química de los ácidos nucleicos. El químico suizo Friedrick Miescher fue el primero en estudiar el DNA, en 1868. Tras separar los núcleos del citoplasma celular, aisló una sustancia ácida de los núcleos a la que llamó **nucleína**. Miescher demostró que la nucleína contenía grandes cantidades de fósforo pero no de azufre, características que la diferenciaba de las proteínas.

Cuando las técnicas analíticas mejoraron se observó que los ácidos nucleicos, incluyendo el DNA, estaban formados por cuatro bloques moleculares similares llamados nucleótidos. Hacia 1910, Phoebus A. Levene propuso la **hipótesis del tetranucleótido** para explicar la disposición química de los nucleótidos en los ácidos nucleicos. Propuso que una unidad simple de cuatro nucleótidos, como la mostrada en la Figura 10.2, se repetía a lo largo del DNA. Levene basó su propuesta en estudios de la composición de los cuatro tipos de nucleótidos. Aunque sus datos reales mostraban que las proporciones de los cuatro nucleótidos variaban considerablemente, el supuso una proporción de 1:1:1:1. Esta discrepancia fue atribuida a técnicas analíticas inadecuadas.

Como una estructura de cuatro nucleótidos unidos covalentemente es relativamente simple, los genéticos creyeron que los ácidos nucleicos no suministraban la suficiente cantidad de variación química que se esperaba para el material genético. Las proteínas, en cambio, contienen 20 aminoácidos diferentes, lo que proporciona la base para una variación substancial. El resultado de todo esto fue que se desvió la atención de los ácidos nucleicos, reforzando las especulaciones de que las proteínas eran el material genético.

El tercer factor que contribuyó a estas creencias fue simplemente un asunto de las áreas de investigación más activas en genética. Antes de 1940, la mayoría de los genéticos estaban ocupados en el estudio de la genética de la transmisión y en la mutación. El entusiasmo generado en estas áreas diluyó sin duda la preocupación por encontrar la molécula precisa que servía de material genético. Así, las proteínas eran los candidatos más prometedores y fueron aceptados de manera más bien pasiva.

Entre 1910 y 1930 se hicieron otras propuestas sobre la estructura de los ácidos nucleicos, pero en general fueron abandonadas en beneficio de la hipótesis del tetranucleótido. No fue hasta la década de 1940 en que el trabajo de Erwin Chargaff hizo comprender que la hipótesis de Levene era incorrecta. Chargaff mostró que, en la mayoría de organismos, la relación de 1:1:1:1 era inexacta, refutando así la hipótesis de Levene.

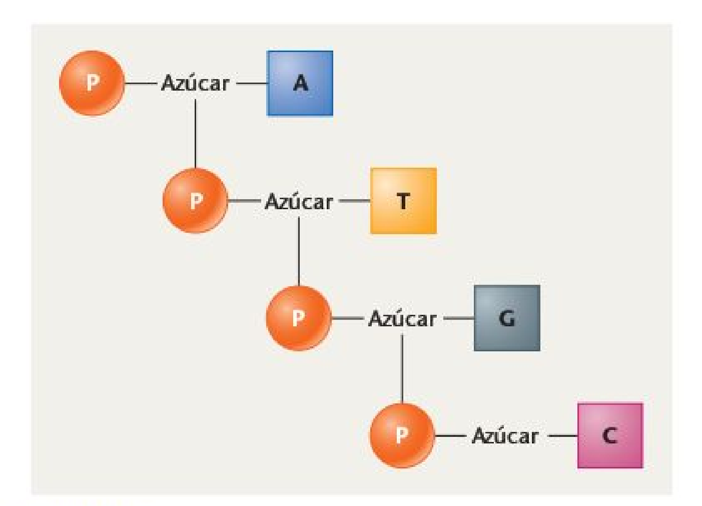


FIGURA 10.2 Representación esquemática del tetranucleótido propuesto por Levene que contiene una molécula de cada una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Cada cuadrado representa una base nitrogenada. También son posibles otras secuencias diferentes de los cuatro nucleótidos.

10.3 Las pruebas a favor del DNA como material genético se obtuvieron inicialmente mediante el estudio de bacterias y bacteriófagos

El suceso inicial que condujo a la aceptación del DNA como material genético fue la publicación en 1944 de Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty sobre la naturaleza química de un «principio transformante» en bacterias. Este trabajo, junto con posteriores descubrimientos por parte de otros equipos de investigación, constituyó la prueba experimental directa de que el DNA, y no las proteínas, es la biomolécula responsable de la herencia. Este hallazgo supuso el inicio de la era de la genética molecular, un periodo de descubrimientos en biología que ha servido de fundamento a los estudios actuales en biotecnología y que nos ha acercado a la comprensión de las bases de la vida. El impacto de estos descubrimientos iniciales sobre la investigación y el pensamiento futuros corre paralelo al trabajo que siguió a la publicación de la teoría de la evolución de Darwin y al posterior redescubrimiento de los postulados de Mendel sobre genética de la transmisión. En conjunto, estos sucesos constituyen las tres grandes revoluciones en biología.

Transformación: los estudios iniciales

La investigación que proporcionó la base para el trabajo de Avery, MacLeod y McCarty la inició Frederick Griffith, oficial médico del Ministerio de Sanidad Británico, en 1927. Realizó experimentos con varias cepas diferentes de la bacteria *Diplococcus pneumoniae*[1]. Algunas cepas eran **virulentas** (infecciosas), es decir, causan neumonía en algunos vertebrados (principalmente en la especie humana y en el ratón), mientras que otras no lo eran (**avirulentas** o no infecciosas), es decir, no causan la enfermedad.

La diferencia de carácter virulento viene dada por la cápsula de polisacáridos de la bacteria. Las cepas virulentas están encapsuladas, mientras que las no virulentas no lo están. Las bacterias sin cápsula son fagocitadas y destruidas fácilmente por las células fagocitarias del sistema circulatorio de los animales. Las bacterias virulentas, que poseen la cubierta de polisacáridos, son difíciles de fagocitar. Por lo tanto, pueden multiplicarse y causar la neumonía.

La presencia o ausencia de cápsula es también la base de otra diferencia característica entre las cepas virulentas y las no virulentas. Las bacterias encapsuladas forman colonias lisas y brillantes (llamadas *S* del inglés *smooth*) al cultivarlas en placas de agar; las cepas no encapsuladas producen colonias rugosas (*R*) (Figura 10.3). Esta característica permite distinguir fácilmente las cepas virulentas de las no virulentas mediante técnicas microbiológicas normales de cultivo.

Cada cepa de *Diplococcus* puede estar formada por una docena de tipos diferentes denominados **serotipos**. La especificidad del serotipo viene dada por la estructura química fina del polisacárido que forma la gruesa y viscosa cápsula. Los serotipos se identifican mediante técnicas inmunológicas y se nombran generalmente con números romanos. En los Estados Unidos, los tipos I y II son la causa más común de neumonía. En los experimentos esenciales que condujeron a los nuevos conceptos sobre el material genético, Griffith usó los tipos II y III. La Tabla 10.1 resume las características de las dos cepas de Griffith.

A partir del trabajo de otros investigadores, Griffith sabía que sólo las células virulentas vivas producían neumonía en ratones. Si se inyectan en el ratón bacterias virulentas muertas por calor, no provocan neumonía, del mismo modo que las bacterias no virulentas vivas tampoco la producen. En su experimento decisivo (Figura 10.3), Griffith inyectó a ratones células vivas II*R* (no virulentas) junto con células III*S* (virulentas) muertas por calor. Como ninguno de los dos tipos de células causaba la muerte de los ratones cuando se inyectaban por separado, Griffith esperaba que la doble inyección tampoco les mataría. Pero, después de cinco días, todos los ratones que habían recibido la doble inyección habían muerto. El análisis de la sangre de los ratones muertos mostró grandes cantidades de bacterias vivas del tipo III*S* (virulentas).

Hasta donde se pudo determinar, el tipo de polisacárido de la cápsula de estas bacterias III*S* era idéntico al de la cepa III*S* a partir de la que se había hecho el preparado celular muerto por calor. Los ratones control, a los que para este experimento se les había inyectado bacterias no virulentas II*R*, no desarrollaron neumonía, manteniéndose sanos. Este hecho anulaba la posibilidad de que las células II*R* no virulentas sencillamente hubiesen cambiado (o mutado) a células III*S* virulentas en ausencia de la fracción III*S* muerta por calor. Por el contrario, se requería algún tipo de interacción entre las células II*R* vivas y las III*S* muertas por calor.

La conclusión de Griffith fue que las bacterias III*S* muertas por calor eran responsables de alguna manera de convertir las células II*R* no virulentas en III*S* virulentas. Llamó a este fe-

TABLA 10.1 CEPAS DE *DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE* UTILIZADAS POR FREDERICK GRIFFITH EN SUS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIONES

Serotipo	Morfología de la colonia	Cápsula	Virulencia
II*R*	Rugosa	Ausente	No virulenta
III*S*	Lisa	Presente	Virulenta

[1] Actualmente, este organismo recibe el nombre de *Streptococcus pneumonia*.

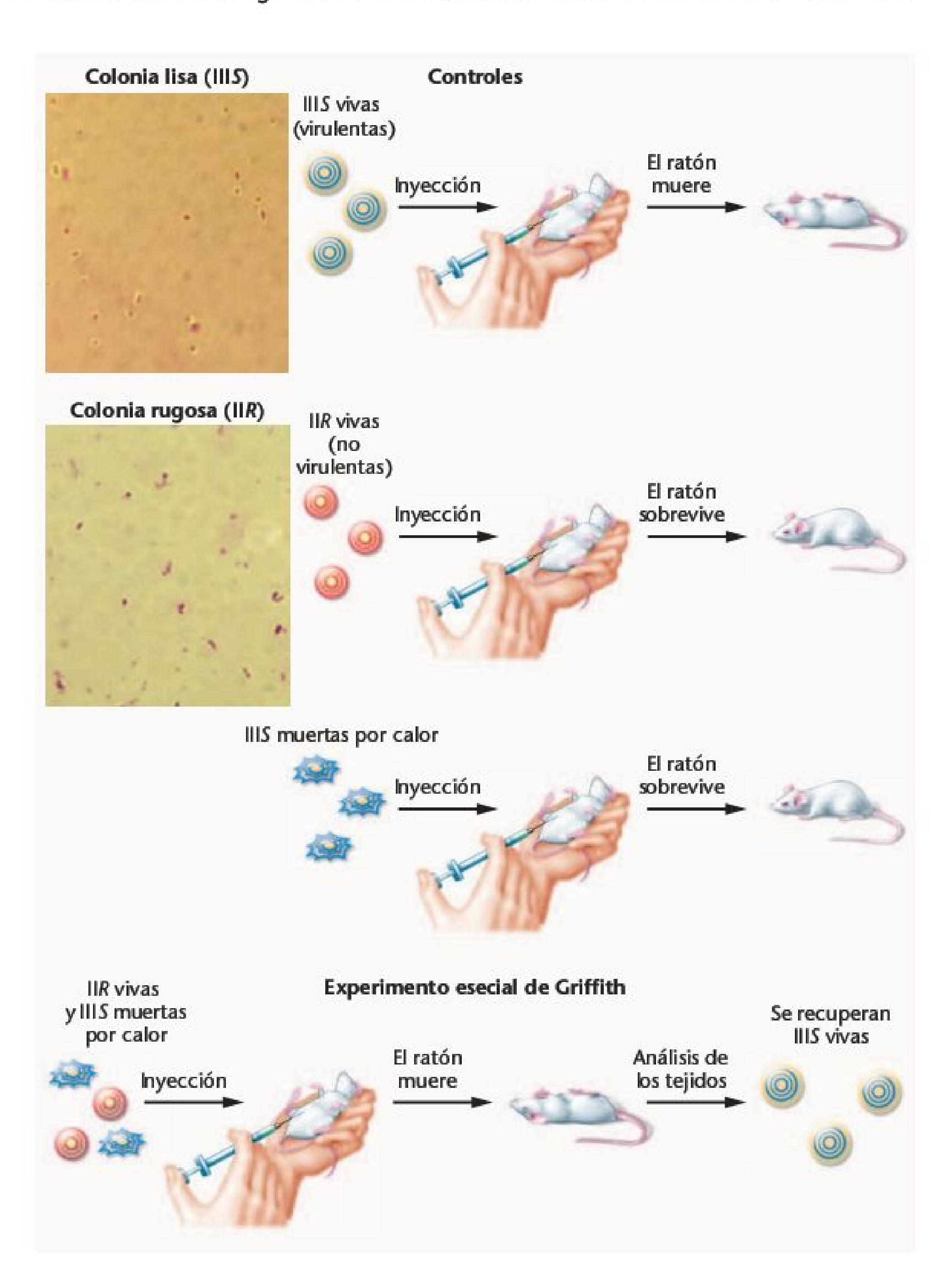


FIGURA 10.3 Experimento de transformación de Griffith. Las fotografías muestran colonias bacterianas que contienen células con cápsula (tipo III*S*) y sin cápsula (tipo II*R*).

nómeno **transformación**, y sugirió que el **principio transformante** podría ser alguna parte de la cápsula de polisacáridos *o* algún compuesto necesario para la síntesis de la cápsula, aunque la cápsula no causase neumonía por sí sola. Usando las palabras de Griffith, el principio transformante de las células III*S* servía como «alimento» (Griffith usó la palabra latina «pabulum») para las células II*R*.

El trabajo de Griffith llevó a otros médicos y bacteriólogos a investigar el fenómeno de la transformación. En 1931, Henry Dawson, del Rockefeller Institute, confirmó las observaciones de Griffith y amplió su trabajo. Dawson y sus colaboradores demostraron que la transformación puede darse *in vitro* (dentro de un tubo de ensayo). Si se incubaban células III*S* muertas por calor junto con células II*R* vivas, se recuperaban células III*S* vivas. Por tanto, no es necesario inyectar ratones para que se de la transformación. En 1933, Lionel J. Alloway refinó los experimentos *in vitro* al usar extractos crudos de células *S* y células *R* vivas. El filtrado soluble obtenido de las células *S* muertas por calor era tan efectivo para inducir transformación como las células intactas. Alloway y otros no asociaron la transformación con un proceso genético, sino más bien con algún tipo de modificación fisiológica. No obstante, las pruebas experimentales de que una sustancia química era la responsable de la transformación eran convincentes.

Transformación: el experimento de Avery, MacLeod y McCarty

Por supuesto, la pregunta más importante era qué molécula servía de principio transformante. En 1944, tras 10 años de trabajo, Avery, MacLeod y McCarty publicaron los resultados que están considerados actualmente como un artículo clásico en el campo de la genética molecular. En este artículo informaron de que habían obtenido el principio transformante en estado puro y que, más allá de cualquier duda razonable, el DNA era la molécula responsable de la transformación.

La Figura 10.4 presenta, en esquema, los detalles del trabajo denominado a menudo como el experimento de Avery, MacLeod y McCarty. Estos investigadores empezaron el proceso de aislamiento con grandes cantidades de cultivos líquidos (de 50 a 75 litros) de células III*S* virulentas. Se centrifugaron las células, se recogieron y se mataron por calor. Tras homogeneizar y extraer varias veces con un detergente llamado desoxicolato (DOC), obtuvieron un filtrado soluble que, una vez probado, seguía conteniendo el principio transformante. Se eliminaron las proteínas del filtrado activo mediante varias extracciones en cloroformo, y los polisacáridos fueron digeridos enzimáticamente y eliminados. Finalmente, una precipitación con etanol produjo una masa fibrosa que mantenía la capacidad de inducir transformación a células del tipo II*R* no virulentas. De los 75 litros originales de la muestra, este procedimiento produjo entre 10 y 25 mg del «factor activo».

Nuevas pruebas establecieron con claridad que el DNA era el principio transformante. Inicialmente se analizó la proporción nitrógeno/fósforo de la masa fibrosa, coincidiendo ésta con la del «desoxirribonucleato sódico», nombre químico que se daba por aquel entonces al DNA. Para dar más solidez a sus descubrimientos, trataron de eliminar, tanto como fuese posible, todos los contaminantes que pudiera tener su producto final. Para ello, lo trataron con las enzimas proteolíticas tripsina y qui-

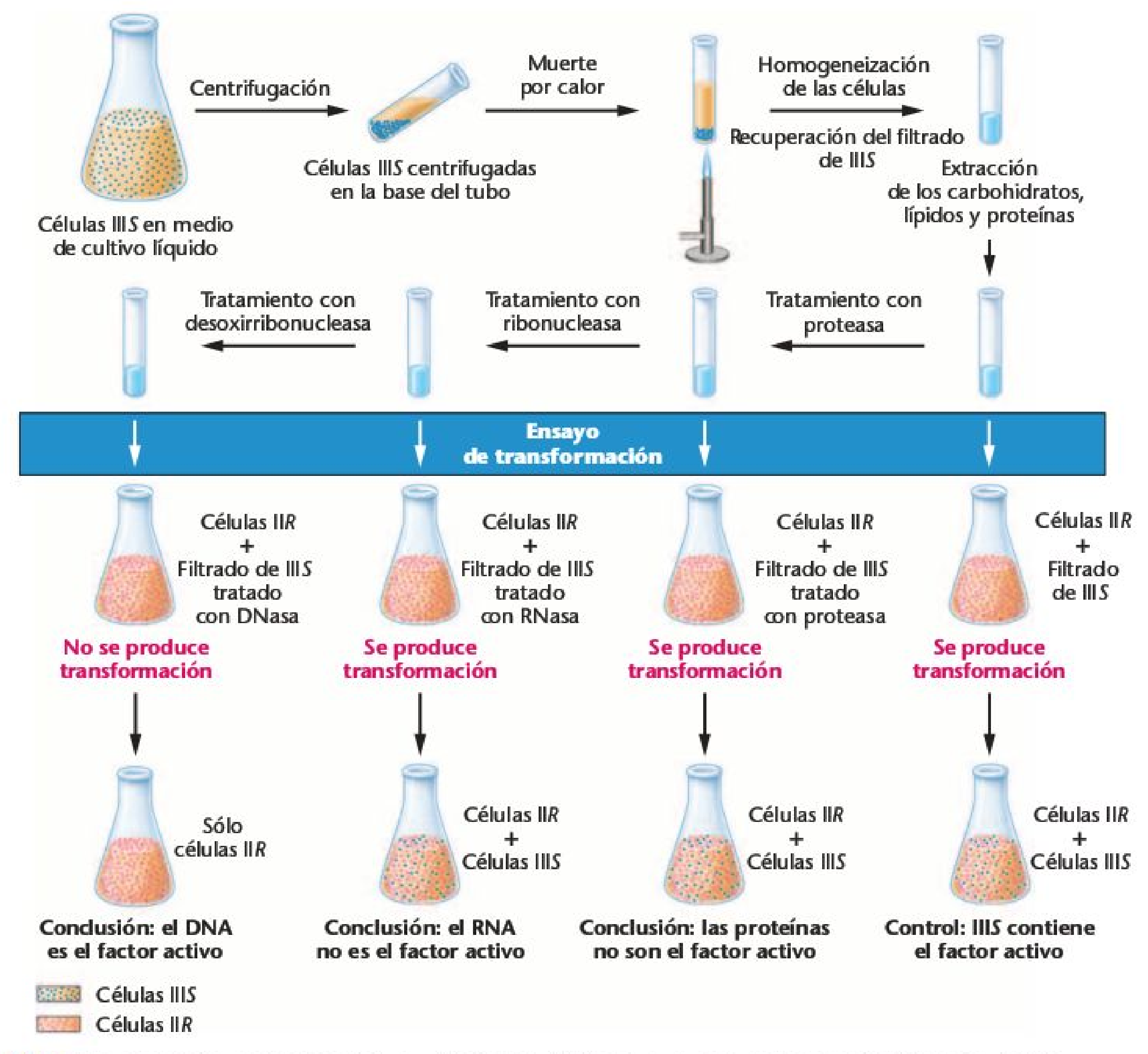


FIGURA 10.4 Resumen del experimento de Avery, MacLeod y McCarthy que demuestra que el DNA es el principio

miotripsina, y posteriormente con una enzima que digiere el RNA, la denominada **ribonucleasa** (**RNasa**). Estos tratamientos destruyeron cualquier resto de proteínas y de RNA. Sin embargo, la actividad transformante permanecía. Pruebas químicas del producto final dieron fuertes reacciones positivas para el DNA. La confirmación final vino de experimentos en los que se utilizaron muestras crudas de **desoxirribonucleasa** (**DNasa**), una enzima que digiere el DNA, y que fue aislada a partir de suero de perro y conejo. La digestión con esta enzima destruyó la actividad transformante. Pocas dudas podía haber de que el principio activo transformante fuese el DNA.

La gran cantidad de trabajo, las comprobaciones y recomprobaciones de las conclusiones y la lógica inequívoca del diseño experimental de la investigación de estos tres científicos son realmente impresionantes. Sin embargo, las conclusiones de la publicación de 1944 fueron expuestas de una manera muy simple: «La prueba presentada apoya el hecho de que un ácido nucleico de tipo desoxirribosa es la unidad fundamental del principio transformante del *Pneumococcus* Tipo III».

Avery y sus colaboradores reconocieron las implicaciones genéticas y bioquímicas de su trabajo al observar que «los ácidos nucleicos de este tipo no sólo deben ser considerados importantes estructuralmente sino también funcionalmente puesto que determinan las actividades bioquímicas y las características específicas de las células de neumococos». Esto sugería que el principio transformante interaccionaba con las células II*R* dando lugar a una serie de reacciones enzimáticas coordinadas que culminaban en la síntesis de la cápsula de polisacáridos del tipo III*S*. Estos científicos subrayaron que, una vez ocurre la transformación, las sucesivas generaciones también producen la cápsula de polisacáridos. Por lo tanto, la transformación es hereditaria, y el proceso afecta al material genético.

Tras la publicación de este artículo, diversos investigadores dirigieron o intensificaron sus estudios de transformación para aclarar la función del DNA en los mecanismos genéticos. En particular, el trabajo de Rollin Hotchkiss contribuyó a confirmar que el DNA es el factor esencial de la transformación, y no las proteínas. En 1949, en un estudio distinto, Harriet Taylor aisló una cepa mutante **extremadamente rugosa** (***ER***) a partir de una cepa rugosa (*R*). La cepa *ER* producía colonias que eran más irregulares que las de la cepa *R*. El DNA de la cepa *R* efectuaba la transformación de la cepa *ER* en la cepa *R*. De esta manera, la cepa *R*, que era la receptora en los experimentos de Avery, demostró que también era capaz de ser dadora de DNA en transformaciones.

La transformación se ha demostrado en *Hemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Shigella paradysenteriae* y en *Escherichia coli*, entre muchos otros microorganismos. También se ha demostrado la transformación de numerosas características genéticas distintas de la morfología de las colonias, como la resistencia a antibióticos y la capacidad de metabolizar diversos nutrientes. Estas observaciones fortalecieron la creencia de que, más que un simple cambio fisiológico, la transformación es básicamente un fenómeno genético. Esta idea se tratará de nuevo al final de este capítulo en la sección «Ideas y soluciones».

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la base experimental que permite concluir que el DNA, y no el RNA ni las proteínas, es el material transformante?

El experimento de Hershey-Chase

El segundo conjunto de pruebas que apoyaba al DNA como material genético lo proporcionó el estudio de la infección de la bacteria *Escherichia coli* por uno de los virus que la utiliza como huésped, el **bacteriófago T2**. Denominado a menudo **fago** para abreviar, este virus está formado por una cubierta proteica que envuelve un núcleo de DNA. Micrografías electrónicas han revelado que la estructura externa del fago está formada por una cabeza hexagonal y una cola. La Figura 10.5 muestra los aspectos generales del ciclo biológico de un bacteriófago T-par, como el T2, tal y como se conocían en 1952. De manera resumida, el fago entra en contacto con la célula bacteriana en la que introduce alguno de sus componentes. Después de la infección, la información vírica «recluta» la maquinaria celular del huésped para llevar a cabo su reproducción. En un período de tiempo razonablemente corto, se ensamblan muchos fagos nuevos, la célula bacteriana se lisa y los descendientes del virus se liberan. Este proceso se denomina **ciclo lítico**.

En 1952, Alfred Hershey y Martha Chase publicaron los resultados de unos experimentos destinados a esclarecer los sucesos que conducen a la reproducción de los fagos. Varios de los experimentos establecieron claramente las funciones independientes de la proteína y del ácido nucleico del fago durante el proceso de reproducción asociado a la célula bacteriana. En la época de Hershey y Chase se sabía que:

1. Los fagos T2 estaban formados aproximadamente por un 50 por ciento de proteína y un 50 por ciento de DNA.
2. La infección se iniciaba por la unión de las fibras de la cola del fago a la célula bacteriana.
3. La producción de nuevos virus se daba dentro de la célula bacteriana.

Parecía que algún componente molecular del fago, el DNA y/o la proteína, entraba en la célula bacteriana y dirigía la reproducción vírica. ¿Cuál de ellos era?

Para poder seguir los componentes moleculares de los fagos durante la infección, Hershey y Chase utilizaron los radioisótopos ^{32}P y ^{35}S (Figura 10.6). El ^{32}P marca específicamente el DNA ya que éste contiene fósforo (P) pero no azufre, y el ^{35}S marca las proteínas ya que éstas contienen azufre (S) pero no fósforo. *Este fue el punto clave del experimento.* Si se cultivan las células de *E. coli* en presencia de ^{32}P *o* ^{35}S y se infectan posteriormente con virus T2, los hijos del fago tendrán marcado



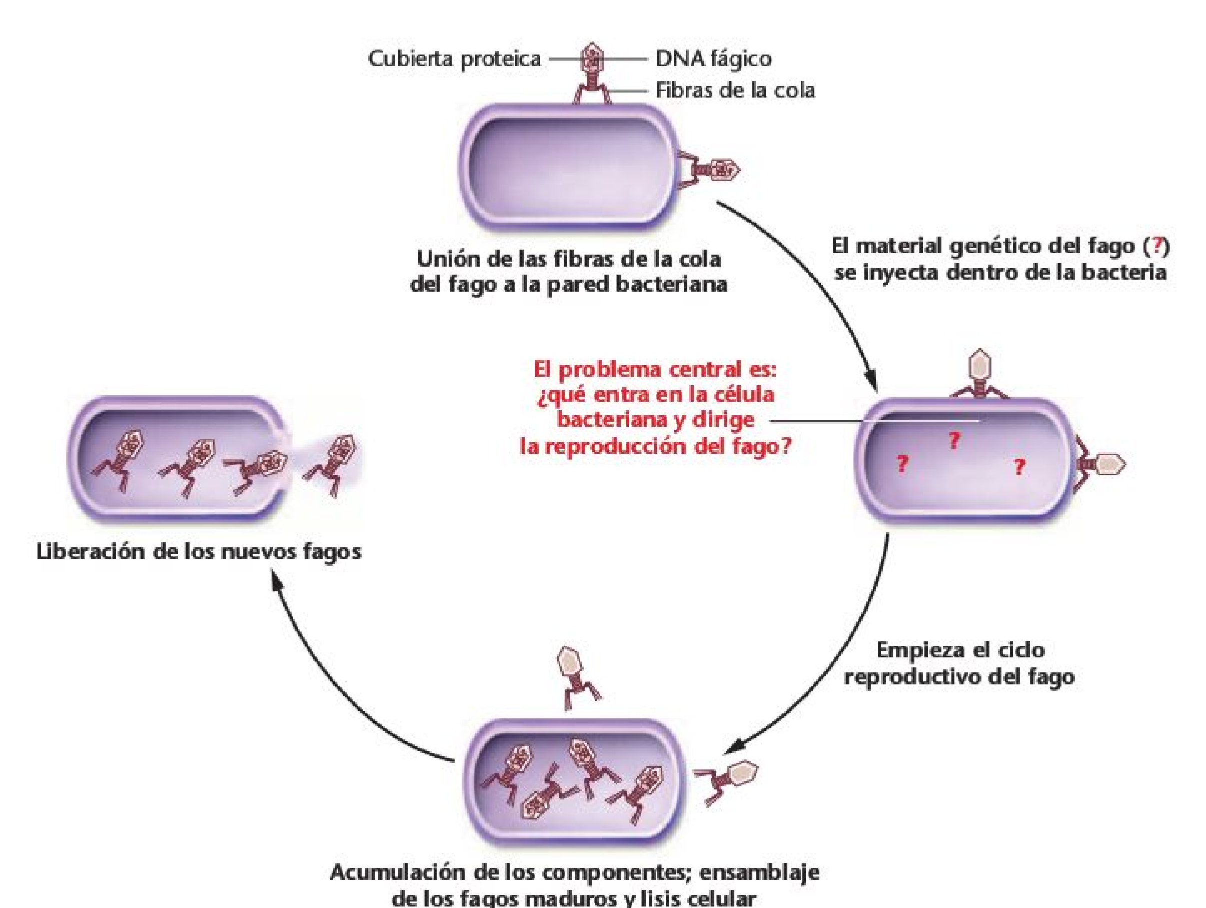


FIGURA 10.5 Ciclo vital de un bacteriófago T-par, como se conocía en 1952. La micrografía electrónica muestra *E. coli* siendo infectada por numerosos fagos.

radiactivamente el núcleo de DNA *o* la cubierta proteica, respectivamente. Los fagos marcados pueden aislarse y usarse para infectar bacterias no marcadas.

Cuando se mezclan fagos marcados y bacterias no marcadas, los fagos unen las fibras de la cola a la pared bacteriana formando un complejo de adsorción. Estos complejos se aislaron y se sometieron en una licuadora a una fuerte agitación. La fuerza de agitación separó los fagos que estaban unidos a la pared bacteriana. Al centrifugar la mezcla, las partículas fágicas, más ligeras que las bacterianas, se separaron de las células bacterianas, permitiendo así aislar ambos componentes (Figura 10.6). Hershey y Chase pudieron demostrar, tras detectar los radioisótopos, que la mayoría del DNA marcado con ^{32}P se había transferido al interior de las células bacterianas después de la adsorción; por otro lado, tras un tratamiento con la licuadora, la mayoría de la proteína marcada con ^{35}S permanecía fuera de la célula bacteriana, en las cubiertas vacías de los fagos («fantasmas»). Después de esta separación, las células bacterianas, que contenían ahora el DNA vírico, se lisaron al producirse los nuevos fagos. Los fagos de la progenie contenían ^{32}P pero no ^{35}S.

Hersey y Chase interpretaron estos resultados como una indicación de que la proteína de la cubierta del fago permanece fuera de la célula huésped y no está implicada en dirigir la producción de nuevos fagos. Por otro lado, y más importante aún,

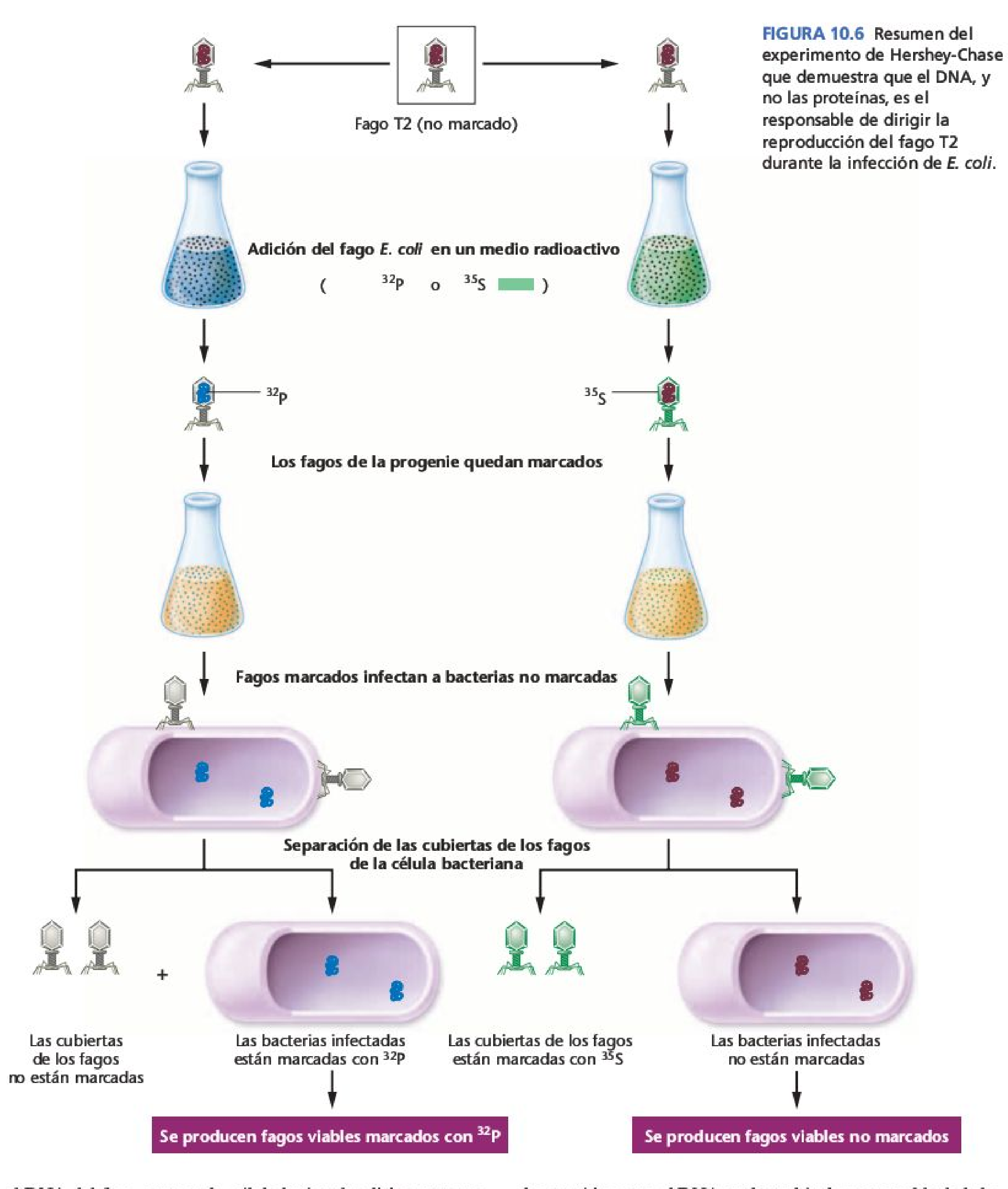


FIGURA 10.6 Resumen del experimento de Hershey-Chase que demuestra que el DNA, y no las proteínas, es el responsable de dirigir la reproducción del fago T2 durante la infección de *E. coli*.

el DNA del fago entra en la célula huésped y dirige su reproducción. Habían demostrado que, en el fago T2, el material genético es el DNA, y no la proteína.

Estos experimentos, junto con los de Avery y sus colaboradores, proporcionó pruebas convincentes para la mayoría de los genéticos que el DNA era la molécula responsable de la herencia. Desde entonces, muchos descubrimientos importantes se han basado en esta suposición. En los siguientes capítulos se tratan detalladamente estos descubrimientos, que constituyen el campo de la genética molecular.

Ahora resuelva esto

El Problema 10.7 de la página 298 pregunta si el protocolo del experimento de Hersey-Chase podría funcionar si fuese aplicado para investigar la transformación.

Sugerencia: Cuando intente aplicar el protocolo de Hersey-Chase, recuerde que en la transformación el DNA exógeno entra directamente en la célula que va a ser transformada, sin que en este proceso se vea implicado ningún contacto célula-célula.

Experimentos de transfección

En los ocho años posteriores a la publicación del experimento de Hershey-Chase, nuevas investigaciones en las que se usaron virus bacterianos suministraron pruebas incluso más sólidas de que el DNA es el material genético. En 1957, varias publicaciones demostraron que si se trata a *E. coli* con la enzima lisozima, se puede quitar la pared externa de la célula sin destruir a la bacteria. Hablando coloquialmente, las células tratadas enzimáticamente están desnudas, siendo la membrana celular su capa más externa. Estas estructuras se denominan **protoplastos** (o **esferoplastos**). John Spizizen y Dean Fraser publicaron de manera independiente que utilizando esferoplastos se podía iniciar la reproducción de fagos con partículas T2 rotas. Es decir, si no hay pared celular, no es necesario que el virus esté intacto para que se produzca la infección. De este modo, la cubierta proteica puede ser esencial para el paso de DNA a través de la pared celular intacta pero, si se usan protoplastos, dicha cubierta no es esencial para la infección.

George Guthrie y Robert Sinsheimer publicaron en 1960 un experimento similar, aunque más elaborado. Purificaron DNA del bacteriófago ϕX174, un fago pequeño que contiene una molécula de DNA de cadena sencilla de 5386 nucleótidos. Si se añade DNA purificado del fago a protoplastos de *E. coli*, se obtienen bacteriófagos ϕX174 completos. Este proceso de infección producido por el ácido nucleico vírico aislado, denominado **transfección**, probó de manera concluyente que el DNA de ϕX174 contiene toda la información necesaria para producir virus maduros. De este modo, se reforzaron las pruebas que respaldaban la conclusión de que el DNA sirve de material genético, aunque todas las pruebas directas hasta el momento se habían obtenido en bacterias y virus.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la base experimental que permite concluir que el DNA, y no las proteínas, es la molécula responsable de dirigir la reproducción de los bacteriófagos? ¿Este experimento permite distinguir entre el DNA y el RNA como molécula responsable?

10.4 Pruebas indirectas y directas apoyan el concepto de que el DNA es el material genético en eucariotas

En 1950, los organismos eucariotas no eran adecuados para realizar la clase de experimentos que demostraron que el DNA es el material genético en bacterias y en virus. Sin embargo, se suponía, en general, que el material genético debía ser una sustancia universal, y que por lo tanto también desempeñaría esta función en los eucariotas. Esta suposición se basaba, inicialmente, en diversas observaciones circunstanciales (indirectas) que, en conjunto, apoyaban que el DNA sirve de material genético en los eucariotas. Posteriormente, pruebas directas establecieron de manera inequívoca la función central del DNA en los procesos genéticos.

Prueba indirecta: distribución del DNA

El DNA debería encontrarse donde realiza su función - en el núcleo, formando parte de los cromosomas. Tanto el DNA como las proteínas cumplen este criterio. Sin embargo, las proteínas también son abundantes en el citoplasma, mientras que el DNA no lo es. Se sabe que tanto las mitocondrias como los cloroplastos realizan funciones genéticas, y que el DNA está presente en estos orgánulos. De este modo, se encuentra únicamente DNA donde se producen las funciones genéticas primarias. Por otro lado, las proteínas se encuentran por toda la célula. Todas estas observaciones son congruentes con la interpretación que favorece al DNA y no a las proteínas como material genético.

Como ya se había establecido que los cromosomas, presentes en el núcleo, contenían el material genético, se esperaba que existiese una correlación entre la ploidía de una célula (p.e., *n*, *2n*, etc.) y la cantidad de molécula que sirve de material genético. Se pueden hacer comparaciones significativas entre la cantidad de DNA y de proteína en gametos (esperma y óvulos) y en células somáticas (corporales). Estas últimas son

TABLA 10.2 CONTENIDO DE DNA DE CÉLULAS HAPLOIDES VERSUS CÉLULAS DIPLODES DE DIVERSAS ESPECIES (EN PICOGRAMOS)

Organismo	*n*	2*n*
Humano	3,25	7,30
Pollo	1,26	2,49
Trucha	2,67	5,79
Carpa	1,65	3,49
Arenque	0,91	1,97

Se ha usado esperma (*n*) y precursores nucleados de glóbulos rojos (2*n*) para comparar los niveles de ploidía.

diploides ($2n$) y tienen el doble de cromosomas que los gametos, que son haploides (n).

La Tabla 10.2 compara la cantidad de DNA encontrado en esperma y en precursores nucleados diploides de glóbulos rojos sanguíneos en distintos organismos. Existe una gran correlación entre la cantidad de DNA y el número de dotaciones cromosómicas. En cambio, a nivel proteico no se observa esta correlación entre gametos y células diploides. Estos datos proporcionan más pruebas circunstanciales que favorecen al DNA sobre las proteínas como el material genético de los eucariotas.

Prueba indirecta: mutagénesis

La **luz ultravioleta (UV)** es uno de los diversos agentes que pueden inducir mutaciones en el material genético. Se pueden irradiar bacterias y otros organismos con diferentes longitudes de onda de luz ultravioleta, y medir la efectividad de cada longitud de onda según el número de mutaciones que induce. Al hacer una gráfica con estos datos se obtiene el **espectro de acción** de la luz UV como agente mutagénico. Este espectro de acción se puede comparar con el **espectro de absorción** de cualquier molécula sospechosa de ser el material genético (Figura 10.7). *Con ello se espera que la molécula que sirva de material genético absorba la luz UV en las longitudes de onda que ésta es mutagénica.*

La máxima acción mutagénica de la luz UV se da a una longitud de onda (l) de 260 nanómetros (nm). Tanto el DNA como el RNA absorben el máximo de luz UV a 260 nm. En cambio, el máximo de absorción de las proteínas se da a 280 nm, longitud de onda en la que no se observan efectos mutagénicos importantes. Esta prueba indirecta apoya la idea de que uno de los ácidos nucleicos es el material genético, y tiende a excluir a las proteínas de esta función.

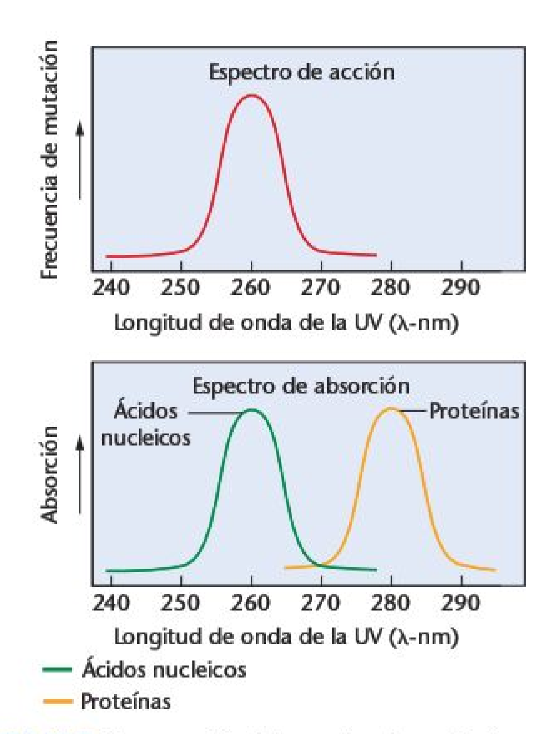


FIGURA 10.7 Comparación del espectro de acción (que determina la longitud de onda UV mutagénica más efectiva) y del espectro de absorción (que muestra el intervalo de longitudes de onda en que los ácidos nucleicos y las proteínas absorben luz UV).

Prueba directas: estudios de DNA recombinante

A pesar de que las evidencias circunstanciales descritas no constituyen una prueba directa de que el DNA es el material genético en eucariotas, estas observaciones estimularon a los científicos a avanzar basando sus trabajos sobre esta hipótesis. Hoy en día no hay ninguna duda sobre la validez de esta conclusión; el DNA *es* el material genético en todos los eucariotas.

La prueba más convincente la proporciona el análisis molecular utilizando técnicas de **tecnología del DNA recombinante**. En tales técnicas, segmentos del DNA eucariótico correspondientes a genes específicos se aíslan y literalmente se cortan y empalman dentro del DNA bacteriano. Dicho complejo puede insertarse en una célula bacteriana y puede detectarse su expresión génica. Si se introduce un gen eucariótico, la presencia del correspondiente producto proteico eucariótico demuestra por completo no sólo que el DNA está presente, sino también que es funcional en la célula bacteriana. Se ha visto que sucede de esta manera en innumerables ocasiones. Por ejemplo, tras la inserción en bacterias de los genes humanos que codifican la insulina y el interferón, estas bacterias producen dichos productos génicos humanos. Al dividirse las bacterias, el DNA eucariótico y el DNA del huésped se replican y se distribuyen a las células hijas, que a su vez también expresan los genes humanos y sintetizan las correspondientes proteínas.

La disponibilidad de grandes cantidades de DNA que codifica genes específicos, disponible como consecuencia de la tecnología del DNA recombinante, ha proporcionado otras pruebas directas de que el DNA es el material genético. Trabajos realizados en el laboratorio de Beatriz Mintz han demostrado que, tras microinyectar en zigotos de ratón el DNA que codifica el gen de la *b-globina* humana, éste está presente y se expresa en los tejidos del ratón adulto, y se transmite a su descendencia donde se continúa expresando. Estos ratones son un ejemplo de lo que se denomina **animales transgénicos**.

Investigaciones más recientes han introducido el DNA de *rata* que codifica una hormona de crecimiento en cigotos de *ratón*. Aproximadamente una tercera parte de los ratones así producidos crecieron hasta el doble de su tamaño normal, lo que indica que el DNA foráneo estaba presente *y* era funcional. Las generaciones posteriores de ratones heredaron esta información genética y también crecieron hasta un tamaño superior al normal.

Retomaremos otra vez el tema del DNA recombinante en capítulos posteriores (véanse los Capítulos 19, 20 y 22). El punto importante en este momento es que, en eucariotas, se ha visto que el DNA satisface exactamente el requisito de expresar la información genética. Más tarde veremos con exactitud cómo se almacena, cómo se replica, cómo se expresa y cómo muta.

10.5 El RNA sirve de material genético en algunos virus

Algunos virus tienen un núcleo de RNA en lugar de DNA. En estos virus, parece que el RNA podría servir de material genético —una excepción a la norma general de que el DNA es quien realiza esta función. En 1956, se demostró que si se purificaba RNA del **virus del mosaico del tabaco (TMV)** y se situaba sobre hojas de tabaco, aparecían en éstas las lesiones características causadas por el TMV. La conclusión fue que el RNA es el material genético de este virus.

Poco después, como se esquematiza en la Figura 10.8, Heinz Fraenkel-Conrat y B. Singer publicaron otro tipo de experimento con el TMV. Estos científicos descubrieron que se podía aislar el núcleo de RNA de la cubierta proteica en TMV salvajes. En este experimento, separaron y aislaron el RNA y la cubierta proteica del TMV y de otra cepa de este virus, el **virus de la nerviación de Holmes** (**HR**, del inglés *Holmes ribgrass virus*). Después, reconstruyeron virus utilizando el RNA de una cepa y las proteínas de la otra. Las lesiones que se desarrollaban al extender este virus «híbrido» sobre hojas de tabaco correspondían al tipo de RNA del virus reconstituido; es decir, virus con el RNA salvaje de TMV y proteínas de cubierta de HR producían las lesiones de TMV y viceversa. De nuevo la conclusión fue que el RNA servía de material genético en estos virus.

En 1965 y 1966, Norman R. Pace y Sol Spiegelman demostraron que el RNA del fago Qβ podía aislarse y replicarse *in vitro*. La replicación dependía de la enzima **RNA replicasa**, que se aisló en células de *E. coli* tras una infección típica. Cuando se añadía el RNA replicado *in vitro* a protoplastos de *E. coli*, se producía infección y replicación vírica. Así, el RNA sintetizado en un tubo de ensayo puede servir perfectamente como material genético en estos fagos dirigiendo la producción de todos los componentes necesarios para la reproducción vírica.

Finalmente, debe mencionarse otro grupo de virus de RNA. Éstos, denominados **retrovirus**, se replican de una manera inusual. Tras infectar la célula huésped, su RNA sirve de molde para sintetizar una molécula de DNA complementaria. El proceso, llamado **retrotranscripción**, es dirigido por una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA llamada **retrotranscriptasa**. Este intermediario de DNA puede incorporarse en el genoma de la célula huésped, y cuando se transcribe el DNA del huésped se producen copias del cromosoma de RNA del retrovirus original. El grupo de los retrovirus comprende entre otros el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), causante del SIDA, y virus causantes de tumores.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se determinó experimentalmente que el RNA sirve de material genético en el virus del mosaico del tabaco?

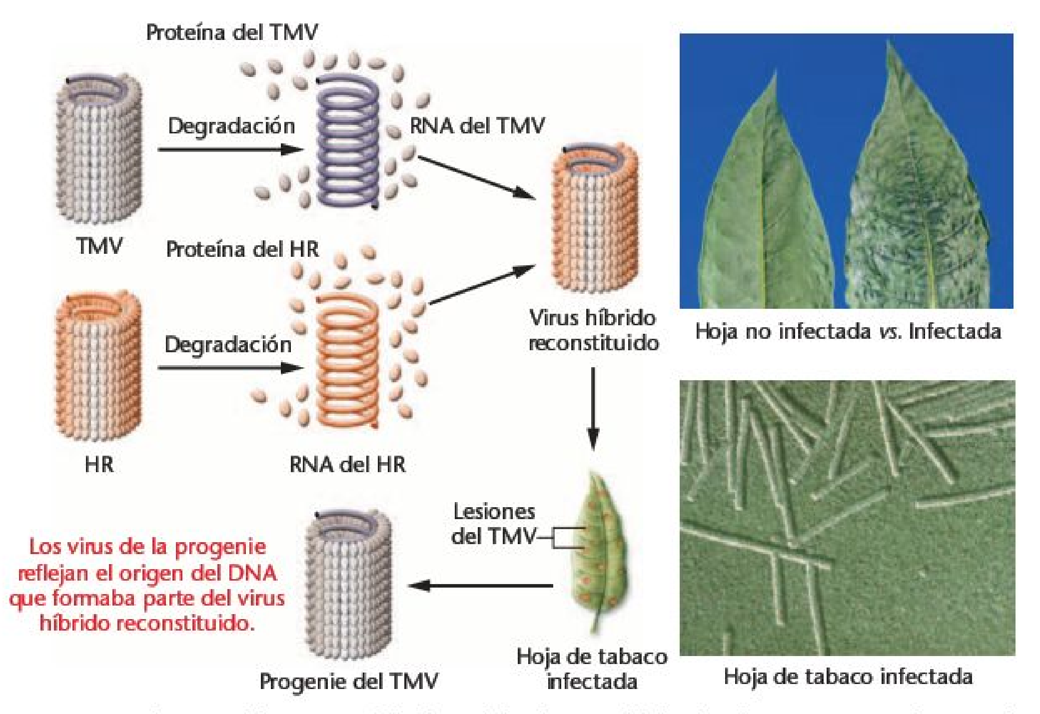


FIGURA 10.8 Reconstrucción de virus del mosaico del tabaco híbridos. En el híbrido, el RNA proviene de TMV silvestres, mientras que las subunidades proteicas provienen de la cepa HR. Después de la infección, los virus producidos presentan subunidades proteicas características de la cepa de TMV silvestre y no de la cepa HR. La fotografía superior compara una hoja de tabaco con lesiones de TMV con una hoja no infectada. La micrografía electrónica inferior muestra virus maduros.

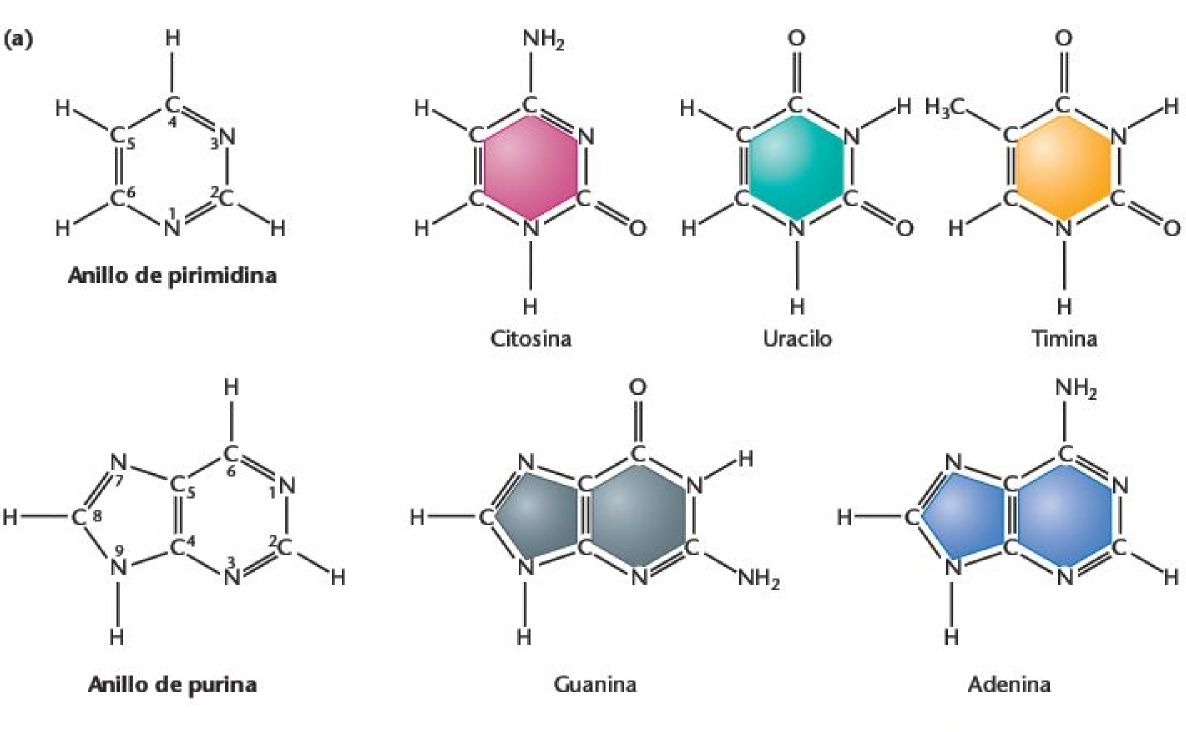
10.6 El conocimiento de la química de los ácidos nucleicos es esencial para entender la estructura del DNA

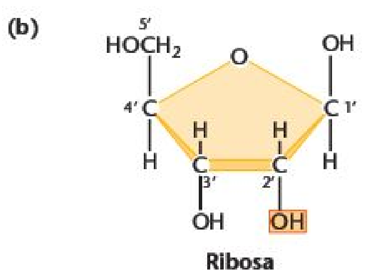
Una vez establecida la gran importancia que el DNA y el RNA tienen en los procesos genéticos, vamos ahora a introducir brevemente la base química de estas moléculas. Como veremos, los componentes estructurales del DNA y del RNA son muy parecidos. Esta similitud química es importante para coordinar las funciones que desempeñan estas moléculas durante la expresión génica. Igual que los otros grupos importantes de biomoléculas orgánicas (proteínas, carbohidratos y lípidos), la química de los ácidos nucleicos se basa en un surtido de piezas parecidas que polimerizan en cadenas de longitud variable.

Los nucleótidos: las piezas que forman los ácidos nucleicos

El DNA es un ácido nucleico, y los **nucleótidos** son las piezas que forman todas las moléculas de ácido nucleico. Estas unidades estructurales, que a veces se denominan mononucleótidos, constan de tres componentes esenciales: una **base nitrogenada**, un **azúcar pentósido** (un azúcar con cinco carbonos) y un **grupo fosfato**. Hay dos tipos de bases nitrogenadas: las **purinas**, un doble anillo de nueve lados, y las **pirimidinas**, un anillo de seis lados. En los ácidos nucleicos se encuentran generalmente dos tipos de purinas y tres tipos de pirimidinas. Las dos purinas son la **adenina** y la **guanina**, abreviadas como **A** y **G,** respectivamente. Las tres pirimidinas son la **citosina**, la **timina** y el **uracilo**, que se abrevian como **C, T** y **U,** respectivamente. La Figura 10.9(a) muestra la estructura química de A, G, C, T y U. Tanto el DNA como el RNA contienen A, C y G; únicamente el DNA contiene la base T, mientras sólo el RNA contiene la base U. Cada átomo de nitrógeno o de carbono de las estructuras anulares de las purinas y pirimidinas se designa por un número (sin la marca de prima). Obsérvese que, en la mayoría de casos, los átomos equivalentes en los dos anillos presentan distinta numeración.

El nombre de los ácidos nucleicos viene dado por el azúcar pentósido que presentan. Los ácidos ribonucleicos (RNA) contienen **ribosa**, mientras que los ácidos desoxirribonucleicos (DNA) contienen **desoxirribosa.** La Figura 10.9(b) muestra la estructura anular de estos dos azúcares pentósidos. Cada átomo de carbono se distingue por un número con el signo prima (por





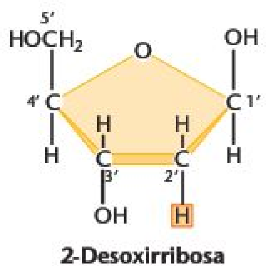


FIGURA 10.9 (a) Estructura química de las pirimidinas y de las purinas que sirven de base nitrogenada en el RNA y en el DNA. En las estructuras de la izquierda se muestra la nomenclatura utilizada para numerar los átomos de carbono y de hidrógeno que forman las dos bases. (b) Estructuras químicas anulares de la ribosa y de la 2-desoxirribosa, que sirven de azúcar pentósido en el RNA y en el DNA respectivamente.

Seminario Web 10.1 Estructura del DNA

ejemplo, C-1′, C-2′). Como puede verse al comparar la ribosa con la desoxirribosa, esta última tiene un átomo de hidrógeno en la posición C-2′ en vez de un grupo hidroxilo. Así pues el RNA se distingue del DNA por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-2′.

Una molécula compuesta por una base —purina o pirimidina— y por un azúcar —ribosa o desoxirribosa— forma una unidad química denominada **nucleósido**. Si se añade un grupo fosfato a un nucleósido, la nueva molécula recibe el nombre de **nucleótido**. Los nucleósidos y los nucleótidos reciben el nombre de la base nitrogenada específica (A, T, G, C o U) que forma parte de la molécula. La Figura 10.10 muestra la nomenclatura y la estructura general de los nucleósidos y los nucleótidos.

La unión entre los tres componentes de un nucleótido es muy específica. El átomo C-1′ del azúcar se une químicamente a la base nitrogenada. Si la base es una purina, el átomo N-9 se une covalentemente al azúcar. Si la base es una pirimidina, la unión se efectúa por el átomo N-1. Los nucleótidos pueden presentar el grupo fosfato unido al átomo C-2′, C-3′ o C-5′ del azúcar. Sin embargo, la configuración C-5′ fosfato que se muestra en la Figura 10.10 es la más frecuente en los sistemas biológicos, y es la que se encuentra en el DNA y el RNA.

Nucleósidos difosfato y trifosfato

Los nucleótidos también pueden describirse con el nombre de **nucleósidos monofosfato (NMP)**. La adición de uno o dos grupos fosfato produce **nucleósidos difosfato (NDP)** y **trifosfato (NTP)**, como se esquematiza en la Figura 10.11. La forma trifosfato es importante ya que sirve de molécula precursora durante la síntesis de los ácidos nucleicos en la célula (véase el Capítulo 11). Además, la **adenosina trifosfato (ATP)** y **guanosina trifosfato (GTP)** son importantes para la bioenergética de la célula debido a la gran cantidad de energía implicada en la adición o separación del grupo fosfato terminal. La hidrólisis de ATP o GTP en ADP o GDP y fosfato inorgánico (P_i) libera gran cantidad de energía en el interior de la célula. Cuando la conversión química de ATP o GTP está acoplada a otras reacciones, la energía producida puede usarse para impulsar la otra reacción. El resultado es que tanto el ATP como el GTP están implicados en muchas actividades celulares, incluyendo numerosos fenómenos genéticos.

Polinucleótidos

La unión entre dos mononucleótidos consiste en un grupo fosfato unido a dos azúcares. Se forma entonces un **enlace fosfodiéster,** ya que el ácido fosfórico se une a dos alcoholes (grupos hidroxilo de los dos azúcares) por una unión éster en ambos lados. La Figura 10.12(a) muestra el enlace fosfodiéster resultante en el DNA. En el RNA se encuentra el mismo enlace. Cada estructura tiene un extremo **C-5′** y uno **C-3′**. La unión de dos nucleótidos forma un **dinucleótido**; la de tres nucleótidos, un **trinucleótido**; y así sucesivamente. Cadenas cortas de menos

Nucleósido

Uridina

Nucleótido

Ácido desoxiadenílico

Ribonucleósidos	Ribonucleótidos
Adenosina Citosina Guanosina Uridina	Ácido adenílico Ácido citidílico Ácido guanílico Ácido uridílico
Desoxirribonucleósidos	**Desoxirribonucleótidos**
Desoxiadenosina Desoxicitosina Desoxiguanosina Desoxitimidina	Ácido desoxiadenílico Ácido desoxicitidílico Ácido desoxiguanílico Ácido desoxitimidílico

FIGURA 10.10 Estructuras y nombres de los nucleósidos y nucleótidos del RNA y del DNA.

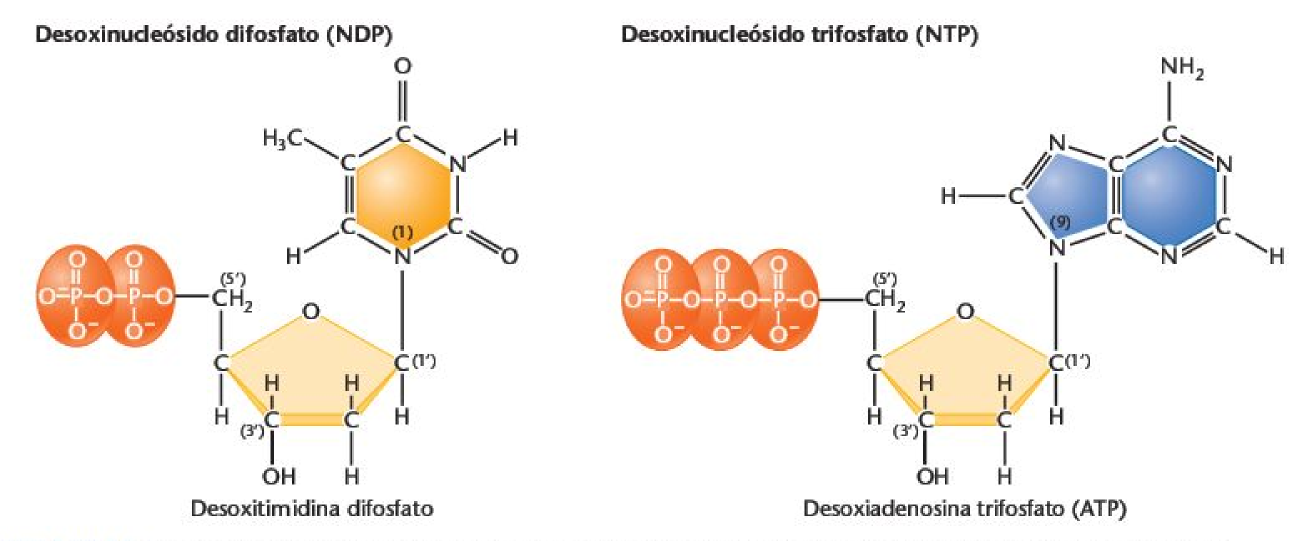


FIGURA 10.11 Estructuras básicas de los nucleósidos difosfato y trifosfato, mostradas como desoxitimidina difosfato y desoxiadenosina trifosfato.

de 20 nucleótidos unidos reciben el nombre de **oligonucleótidos**. Cadenas más largas se denominan **polinucleótidos**.

Dibujar las estructuras de la Figura 10.12(a) es lento y complejo, por lo que se ha ideado un método esquemático abreviado [Figura 10.12(b)]. Las líneas casi verticales representan el azúcar pentósido; la base nitrogenada está unida al extremo superior, la posición C-1′. La línea diagonal con el P en medio se une a la posición C-3′ de un azúcar y a la C-5′ del azúcar vecino, representando así al enlace fosfodiéster. Se usan diversas modificaciones de este método abreviado, aunque todas ellas pueden entenderse siguiendo esta guía.

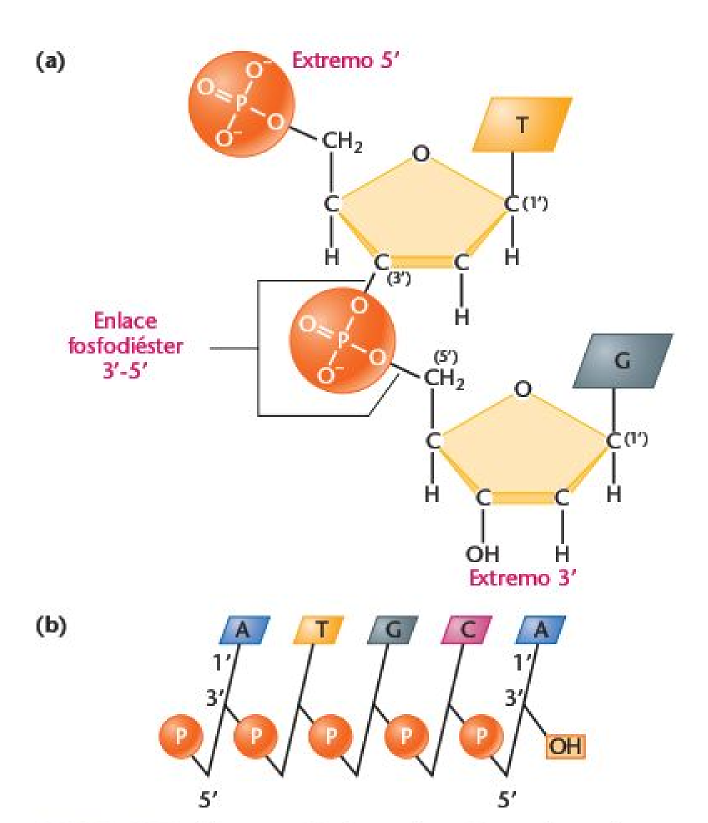


FIGURA 10.12 (a) Unión de dos nucleótidos mediante la formación de un enlace fosfodiéster C-3′-C-5′ (3′-5′), que produce un dinucleótido. (b) Notación abreviada de una cadena polinucleotídica.

Aunque antes de 1940 se aceptaba en general la hipótesis del tetranucleótido de Levene (descrita anteriormente en este capítulo), la investigación en décadas posteriores reveló que era incorrecta. Se había visto que el DNA no contenía necesariamente cantidades equimolares de las cuatro bases. Además, se determinó que el peso molecular de las moléculas de DNA estaba entre 10^6 y 10^9 daltons, demasiado diferente al de un tetranucleótido. La visión actual del DNA es que éste consiste en cadenas de polinucleótidos enormemente largas.

Cadenas largas de polinucleótidos justificarían el peso molecular observado y proporcionarían la base para la propiedad más importante del DNA —el almacenaje de enormes cantidades de información genética. Si cualquiera de los cuatro nucleótidos ocupa cada posición nucleotídica de esta larga cadena, es posible una extraordinaria variación. Por ejemplo, un polinucleótido de sólo 1.000 nucleótidos de longitud puede ordenarse de $4^{1.000}$ maneras distintas, cada una de ellas diferente a todas las demás secuencias posibles. Esta variación potencial de la estructura molecular es esencial si el DNA tiene que cumplir la función de almacenar las enormes cantidades de información química necesarias para dirigir las actividades celulares.

10.7 La estructura del DNA es la clave para entender su función

En las secciones anteriores de este capítulo se ha establecido que el DNA es el material genético de todos los organismos (excepto en determinados virus) y se han proporcionado detalles

de los componentes químicos básicos que forman los ácidos nucleicos. Queda por descifrar la estructura precisa del DNA. Es decir, ¿cómo se organizan las cadenas de polinucleótidos en el DNA que sirve de material genético? ¿Se compone el DNA de una cadena sencilla, o de más de una? Si este último caso es el correcto, ¿cómo se relacionan químicamente las cadenas entre sí? ¿Se ramifican las cadenas? Y todavía más importante, ¿cómo se relaciona la estructura de esta molécula con las distintas funciones genéticas que tiene el DNA (p.e., almacenaje, expresión, replicación y mutación)?

Entre 1940 y 1953, muchos científicos se interesaron en resolver la estructura del DNA. Erwin Chargaff, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin, Linus Pauling, Francis Crick y James Watson buscaron, entre otros, información que pudiese responder a lo que muchos consideraron como la pregunta más importante e intrigante de la historia de la biología: ¿Cómo sirve el DNA de base genética para los procesos de la vida? Se creía que la respuesta dependería, en gran medida, de la estructura química y la organización de la molécula de DNA, dadas las complejas y ordenadas funciones que a ella se atribuían.

En 1953 James Watson y Francis Crick propusieron que la estructura del DNA tiene la forma de una doble hélice. Publicaron su propuesta en un corto artículo en la revista *Nature* (la traducción íntegra del artículo original se reproduce en la página 287). En cierto sentido, este artículo supuso la línea de meta de una carrera científica altamente competida para obtener lo que algunos consideran el hallazgo más importante en la historia de la biología. Esta «carrera», como se cuenta en el libro de Watson *The Double Helix* (véase Lecturas seleccionadas), muestra las muchas facetas de la interacciones humanas que contribuyeron al proyecto de colaboración que condujo finalmente a la resolución de la estructura del DNA.

Los datos de que disponían Watson y Crick, cruciales para el desarrollo de su propuesta, provinieron básicamente de dos fuentes: (1) el análisis de la composición de bases de muestras hidrolizadas de DNA, y (2) estudios de difracción de rayos X del DNA. El éxito analítico de Watson y Crick puede atribuirse a la construcción de un modelo que se ajustaba a los datos existentes. Si comparamos la estructura del DNA con un rompecabezas, Watson y Crick, que trabajaban en el Cavendish Laboratory de Cambridge, Inglaterra, fueron los primeros en encajar con éxito todas las piezas. Puesto que se pretende tratar este descubrimiento de gran alcance, puede interesarles conocer algunos datos de la historia personal de James Watson y Francis Crick. Watson empezó sus estudios de grado (licenciatura) en la Universidad de Chicago a los 15 años de edad, interesándose inicialmente por la ornitología. Después realizó sus estudios de doctorado en la Universidad de Indiana, donde trabajó con virus. En 1953, cuando Crick y él propusieron la teoría de la doble hélice, Watson tenía tan sólo 24 años. Crick, considerado actualmente uno de los grandes biólogos teóricos de nuestro tiempo, estudió física en el University College de Londres, y durante la Segunda Guerra Mundial se dedicó a la investigación militar. Cuando colaboró con Watson tenía 35 años de edad y estaba realizando estudios de difracción de rayos X de polipéptidos y proteínas como estudiante graduado. El día de su descubrimiento más importante, se dice que Crick fue caminando al Eagle Pub de Cambridge, dónde ambos iban a comer a menudo, y dijo para que todos le oyesen: «Hemos descubierto el secreto de la vida». Al final, más de 50 años más tarde, muchos científicos estarían de acuerdo!

Estudios de la composición de bases

Entre 1949 y 1953, Erwin Chargaff y sus colaboradores utilizaron métodos cromatográficos para separar las cuatro bases en muestras de DNA de diversos organismos. Usando métodos cuantitativos, determinaron las cantidades de las cuatro bases de cada una de las fuentes. La Tabla 10.3(a) proporciona algunos de los datos originales de Chargaff. Las partes (b) y (c) de la tabla muestran información más reciente sobre la composición de bases de otros organismos que refuerzan los descubrimientos de Chargaff.

Basándose en estos datos, que debería examinar, se extraen las siguientes conclusiones:

1. Como se muestra en la Tabla 10.3(b), la cantidad de residuos de adenina es proporcional a la cantidad de residuos de timina en el DNA de cualquier especie (columnas 1, 2 y 5). Así mismo, la cantidad de residuos de guanina es proporcional a la cantidad de residuos de citosina (columnas 3,4 y 6).
2. Basándose en esta proporcionalidad, la suma de purinas ($A + G$) es igual a la suma de pirimidinas ($C + T$), como se muestra en la columna 7.
3. El porcentaje de $C + G$ no es necesariamente igual al porcentaje de $A + T$. Como puede verse, la relación entre los dos valores varía enormemente entre especies, como se muestra en la columna 8 y se pone de manifiesto en la Tabla 10.3(c).

Estas conclusiones indican patrones definidos en la composición de bases de las moléculas de DNA. Estos datos también sirven de pista inicial para el rompecabezas. Además, rechazan por completo la hipótesis del tetranucleótido, que postula que las cuatro bases están presentes en cantidades iguales.

Análisis de difracción de rayos X

Cuando las fibras de una molécula de DNA se someten a un bombardeo de rayos X, los rayos se dispersan en función de la estructura atómica de la molécula. El patrón de dispersión (difracción) puede capturarse sobre una película fotográfica en forma de manchas y puede analizarse, especialmente en lo que se refiere a la forma general y las regularidades de la molécula. Este proceso, el análisis de **difracción de rayos X**, había sido usado con éxito por Linus Pauling y otros químicos para el estudio de la estructura proteica. Esta técnica fue probada por William Astbury sobre DNA ya en 1938. En 1947 detectó una

TABLA 10.3 **DATOS DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA**

(a) Datos de Chargaff*

	Proporciones molares[a]			
	1	2	3	4
Organismo/fuente	A	T	G	C
Timo de buey	26	25	21	16
Bazo de buey	25	24	20	15
Levadura	24	25	14	13
Bacilo del tubérculo de las aves	12	11	28	26
Human sperm	29	31	18	18

(c) Contenido de G + C en diversos organismos

Organism	%G + C
Fago T2	36,0
Drosophila	45,0
Maíz	49,1
Euglena	53,5
Neurospora	53,7

(b) Composición de bases del DNA de diversas especies

	Composición de bases				Proporción de bases		Proporción A + T/G + C	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fuente	A	T	G	C	A/T	G/C	(A + G)/(C + T)	(A + T)/(C + G)
Humano	30,9	29,4	19,9	19,8	1,05	1,00	1,04	1,52
Erizo de mar	32,8	32,1	17,7	17,3	1,02	1,02	1,02	1,58
E. coli	24,7	23,6	26,0	25,7	1,04	1,01	1,03	0,93
Sarcina lutea	13,4	12,4	37,1	37,1	1,08	1,00	1,04	0,35
Bacteriófago T7	26,0	26,0	24,0	24,0	1,00	1,00	1,00	1,08

* *Fuente*: Chargaff, 1950.
[a] Moles de constituyentes nitrogenados por mol de P. (A menudo, la recuperación fue inferior al 100%.)

periodicidad de 3,4 ángstroms (Å)* dentro de la molécula, lo que le sugirió que las bases estaban apiladas unas sobre las otras como monedas.

Entre 1950 y 1953, Rosalind Franklin, que trabajaba en el laboratorio de Maurice Wilkins, obtuvo mejores datos de difracción de rayos X a partir de muestras más purificadas de DNA (Figura 10.13). Su investigación confirmó la periodicidad de 3,4 Å vista por Astbury y sugirió que la estructura del DNA era algún tipo de hélice. Sin embargo, no propuso ningún modelo definitivo. Pauling había analizado el trabajo de Astbury y otros y propuso, incorrectamente, que el DNA era una triple hélice.

El modelo de Watson y Crick

Watson y Crick publicaron su análisis sobre la estructura del DNA en 1953. Construyendo modelos ceñidos a la información que acabamos de ver, propusieron la forma de doble hélice del DNA, que se muestra en la Figura 10.14(a). Este modelo tiene las características principales siguientes:

1. Dos largas cadenas polinucleotídicas están enrolladas alrededor de un eje central, formando una doble hélice enrollada hacia la derecha (dextrógira).

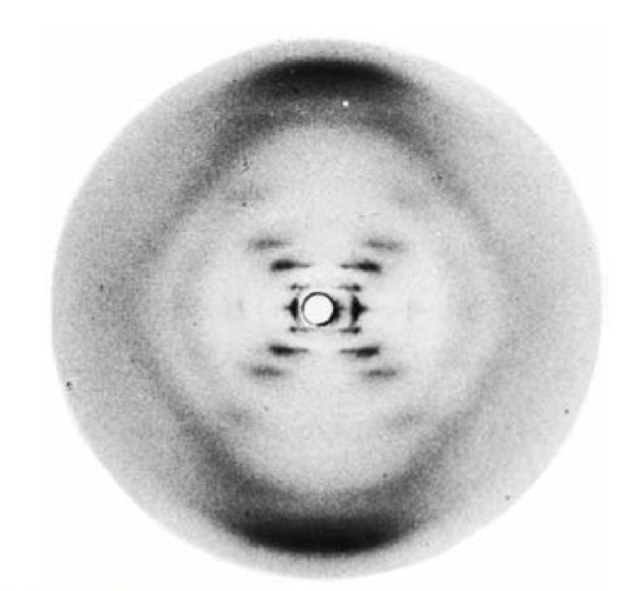


FIGURA 10.13 Fotografía de difracción de rayos X de la forma B de fibras purificadas de DNA. Los arcos oscuros de la periferia muestran aspectos estrechamente relacionados con las dimensiones de la molécula, y proporcionan una estima de la periodicidad de las bases nitrogenadas, que están a 3,4 Å. El patrón de manchas central cruciforme muestra el aspecto global de la molécula, e indica su naturaleza helicoidal.

* Actualmente, se prefieren las medidas en nanómetros (nm) (1 nm = 10 Å).

FIGURA 10.14 (a) Doble hélice del DNA propuesta por Watson y Crick. Las cintas constituyen el esqueleto azúcar-fosfato, y los escalones horizontales constituyen los pares de bases nitrogenadas, de las que hay 10 por cada vuelta. Pueden verse los surcos mayor y menor. La barra vertical que representa el eje central. (b) Imagen ampliada de las bases, los azúcares, los fosfatos y los puentes de hidrógeno de la hélice. (c) Representación del carácter antiparalelo de la hélice y la disposición horizontal de las bases.

2. Las dos cadenas son **antiparalelas**; es decir, la orientación C-5′-C-3′ va en direcciones opuestas.
3. Las bases de las dos cadenas yacen formando estructuras planas y perpendiculares al eje; están «apiladas» unas sobre otras, separadas 3,4 Å (0,34 nm), y se encuentran en el interior de la estructura.
4. Las bases nitrogenadas de las cadenas opuestas están apareadas como resultado de la formación de puentes de hidrógeno (que se describen a continuación); en el DNA sólo se permiten los emparejamientos A═T y G≡C.
5. Cada vuelta completa de la hélice tiene una longitud de 34 Å (3,4 nm); de este modo, cada vuelta de la cadena contiene 10 bases.
6. En cualquier segmento de la molécula, se observa un **surco mayor** y un **surco menor** que se alternan a lo largo del eje.
7. La doble hélice mide 20 Å (2,0 nm) de diámetro.

La característica genéticamente más importante del modelo es la condición del emparejamiento entre bases (Punto 4 anterior). Antes de discutirla detalladamente, deben mencionarse otras características importantes. Primero, la condición antiparalela de las dos cadenas es un punto clave del modelo de la doble hélice. Mientras una cadena discurre orientada 5′-3′ (pareciéndonos derecha), la otra cadena está orientada 3′-5′ (pareciendo así invertida). Esto se esquematiza en la Figura 10.14(c). Dadas las constricciones de los ángulos de enlace entre los distintos componentes de los nucleótidos, no se puede construir fácilmente la doble hélice si ambas cadenas discurren paralelas.

Segundo, la característica dextrógira de la hélice se puede apreciar mejor si se compara esta estructura con su copia levógira, que es una imagen especular de la misma, como se muestra en la Figura 10.15. La conformación espacial de la hélice dextrógira es más congruente con los datos de que disponían Watson y Crick. Como veremos más adelante, existe una hélice levógira de DNA (DNA-Z).

La clave del modelo propuesto por Watson y Crick es la especificidad en el emparejamiento de bases. Los datos de Chargaff sugieren que las cantidades de A y T son iguales, y que las de G y C también. Watson y Crick se dieron cuenta de que si A se empareja con T y C lo hace con G, justificando estas proporciones, los componentes de estos pares de bases formarían

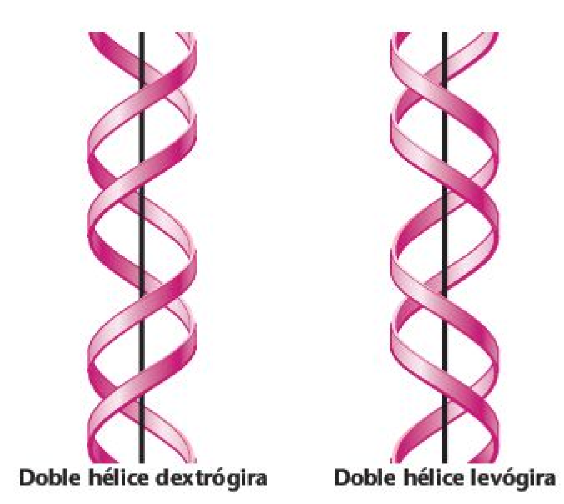


FIGURA 10.15 Formas dextrógira y levógira del DNA. Obsérvese que son imágenes especulares.

puentes de hidrógeno [Figura 10.14(b)], proporcionando la estabilidad química necesaria para mantener las dos cadenas juntas. Ordenadas de este modo, se hace aparente a lo largo del eje un surco mayor y uno menor. Más aún, una purina (A o G) está al otro lado de una pirimidina (T o C) en cada «escalón de la escalera de caracol» de la hélice propuesta, justificando los 20 Å (2 nm) de diámetro sugeridos por los estudios de difracción de rayos X.

El emparejamiento específico entre las bases A═T y G≡C es la base del concepto de **complementariedad**, que describe la afinidad química entre bases proporcionada por los puentes de hidrógeno. Como veremos, este concepto es muy importante en los procesos de replicación y de expresión génica del DNA.

Hay dos preguntas que merecen especialmente ser discutidas. Primero, ¿por qué no son posibles otros pares de bases? Watson y Crick desestimaron los pares A═G y C≡T ya que representan emparejamientos purina-purina y pirimidina-pirimidina respectivamente. Estos emparejamientos producirían una alternancia de diámetros de más de 20 Å y de menos de 20 Å, debido a los tamaños respectivos de los anillos de las purinas y de las pirimidinas; además, las configuraciones tridimensionales formadas por estos emparejamientos no producen la alineación adecuada que conduce a la formación de puentes de hidrógeno. Esta es la razón por la que también fueron descartados los emparejamientos A═C y G≡T, a pesar de que están formados por una purina y una pirimidina.

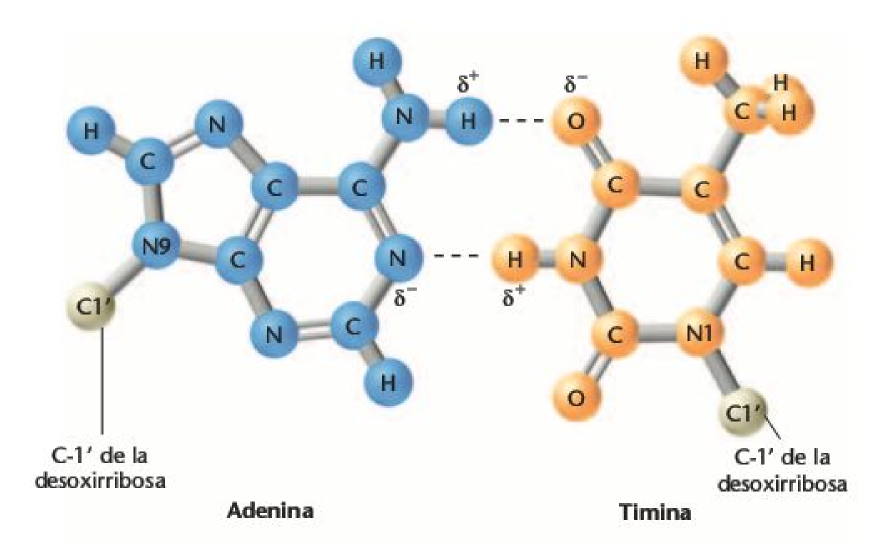
La segunda cuestión se refiere a los puentes de hidrógeno. ¿Cuál es la naturaleza exacta de este puente, y es lo suficientemente fuerte como para estabilizar la hélice? Un **puente de hidrógeno** es una atracción electrostática muy débil entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente y un átomo con un par de electrones no compartidos. El átomo de hidrógeno adquiere una carga positiva parcial, mientras que el par de electrones no compartidos —característico de átomos de oxígeno y de nitrógeno unidos covalentemente— adquiere una carga negativa parcial. Estas cargas opuestas son responsables de una atracción química débil. Orientadas como en la doble hélice (Figura 10.16), la adenina forma dos puentes de hidrógeno con la timina, y la guanina forma tres puentes de hidrógeno con la citosina. Aunque dos o tres puentes de hidrógeno aislados son energéticamente muy débiles, sólo 20 pares de bases estableciendo entre 40 y 60 puentes de hidrógeno imparten una estabilidad considerable. La estabilidad química en la doble hélice de DNA se ve incrementada por los miles de puentes en tándem que se establecen en dúplices más largos (dos cadenas largas de polinucleótidos).

Otro factor estabilizante es la disposición de azúcares y de bases a lo largo del eje. En el modelo de Watson y Crick, las bases nitrogenadas hidrofóbicas el esqueleto azúcar-fosfato hidrofílico está fuera del eje, donde ambos componentes pueden interaccionar con el agua. Las bases nitrogenadas, relativamente hidrofóbicas o «que temen al agua», se encuentran «apiladas» casi horizontalmente en el interior del eje, protegidas del agua. Esta disposición molecular proporciona una importante estabilidad química a la hélice.

Un análisis reciente y más preciso de la forma del DNA que el que sirvió de base para el modelo de Watson-Crick ha revelado una diferencia estructural menor. La medición del número de pares de bases (pb) por vuelta ha dado un valor de 10,4 en vez del de 10,0 predicho por Watson y Crick. En el modelo clásico, cada par de bases está girado 36° sobre el eje de la hélice, mientras que estos nuevos datos indican una rotación de 34,6°. El resultado es que hay algo más de 10 pares de bases en cada giro de 360°.

El modelo de Watson-Crick tuvo un efecto inmediato en la emergente disciplina de la biología molecular. Ya en su artículo inicial de 1953, los autores decían: «No se nos escapa que el emparejamiento específico que postulamos sugiere por sí mismo un posible mecanismo de copia para el material genético». Dos meses más tarde, en un segundo artículo en la revista *Nature*, Watson y Crick ampliaron esta idea, sugiriendo un modelo específico de replicación del DNA —el modelo semiconservativo. Este segundo artículo también aludía a dos nuevos conceptos: (1) el almacenaje de la información genética en la secuencia de bases, y (2) la mutación o cambio genético que resultaría de la alteración de las bases. Estas ideas han recibido un enorme respaldo experimental desde 1953, y en la actualidad son aceptadas universalmente.

La «síntesis» de las ideas de Watson y Crick fue muy importante para posteriores estudios en genética y en biología. Ahora, las características del gen y su función en los mecanismos genéticos pueden verse y estudiarse en términos bioquímicos. En reconocimiento a sus investigaciones, junto con el de Maurice Wilkins, en 1962 se les concedió el premio Nobel de Fisiología o Medicina. Desgraciadamente, Rosalind Franklin murió en 1958 a los 37 años de edad, lo que hizo que sus contribuciones no pudieran ser tenidas en cuenta ya que este premio no puede ser otorgado a título póstumo. Este premio Nobel ha sido uno de los muchos otorgados a trabajos en el campo de la genética molecular.



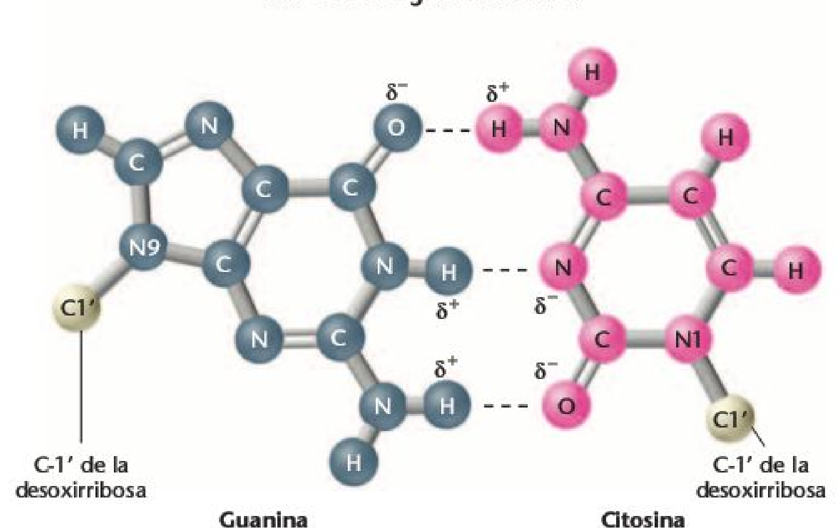


FIGURA 10.16 Modelos de bolas y palos de los pares de bases A═T y G≡C. Las filas de rayas (– – –) representan los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se determinó que la estructura del DNA es una doble hélice dextrógira con las dos cadenas unidas por puentes de hidrógeno que se forman entre bases nitrogenadas complementarias?

10.8 Existen formas alternativas de DNA

Bajo diferentes condiciones de aislamiento, se han reconocido varias formas conformacionales del DNA. Cuando Watson y Crick realizaron sus análisis, se conocían dos formas de DNA —**DNA-A** y **DNA-B**. Los análisis de Watson y Crick se basaron en los estudios de rayos X de Rosalind Franklin de la forma B, presente en condiciones acuosas de baja concentración salina, y que se cree es la conformación con importancia biológica.

Aunque los estudios de DNA de los años 50 se basaban en la utilización de la difracción de rayos X, se han realizado investigaciones más recientes utilizando el **análisis de cristales simples por rayos X**. Los primeros estudios alcanzaban una resolución aproximadamente de 5Å, mientras que en la difracción de rayos X de cristales simples es de 1Å, cercano a la resolución atómica. El resultado es que cada átomo es «visible», obteniéndose un mayor detalle estructural en los análisis.

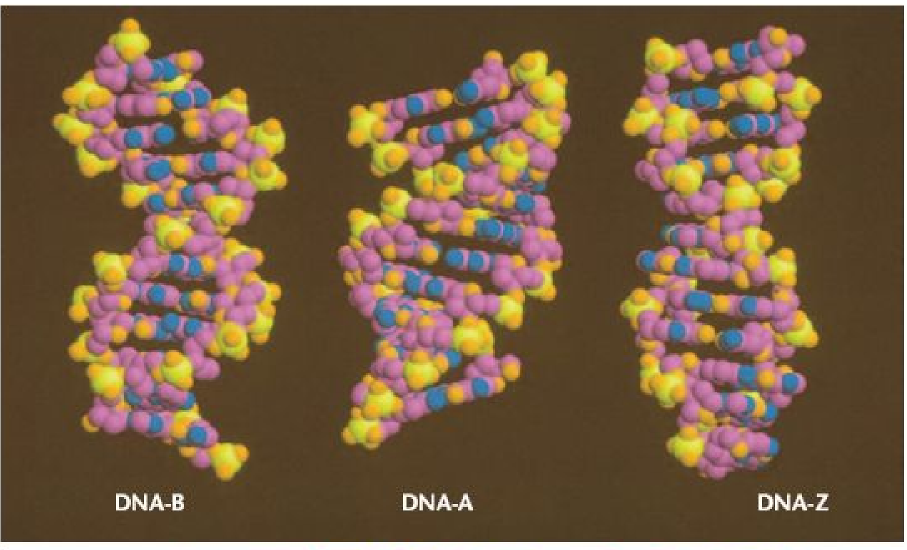
El DNA-A se ha examinado utilizando estas técnicas modernas. Éste es el que prevalece bajo condiciones de alta salini-

dad o de deshidratación. Comparado con el DNA-B (Figura 10.17), el DNA-A es ligeramente más compacto, con 9 pares de bases en cada vuelta completa de la hélice, que tiene a su vez un diámetro de 23 Å. A pesar de que también es dextrógiro, la orientación de las bases es algo diferente. Éstas están inclinadas y desplazadas lateralmente en relación al eje de la hélice. El resultado de estas diferencias, si se compara con el DNA-B, es una modificación en la apariencia del surco mayor y del menor. Es dudoso que el DNA-A se dé en condiciones biológicas.

Se han descubierto otras tres formas de hélice de DNA dextrógiro en condiciones de laboratorio. Se han designado como DNA-C, -D y -E. El **DNA-C** se encuentra en condiciones de mayor deshidratación que en las que se obtiene el DNA-A y -B. Tiene solamente 9,3 pares de bases en cada vuelta y, por lo tanto, es menos compacto. El diámetro de la hélice es de 19 Å. Igual que en el DNA-A, el DNA-C no tiene los pares de bases dispuestos horizontalmente; en vez de esto, están inclinados en relación al eje de la hélice. Las otras dos formas, el **DNA-D** y el **DNA-E**, se producen en hélices cuya composición de bases carece de guanina. Aún tienen menos bases por vuelta: 8 y 7, respectivamente.

Todavía otra forma de DNA, llamada **DNA-Z**, fue descubierta por Andrew Wang, Alexander Rich y sus colaboradores en 1979 cuando examinaban un oligonucleótido sintético de DNA que contenía sólo pares de bases de C-G. El DNA-Z tiene la extraordinaria configuración de una doble hélice levógira (Figura 10.17). Igual que el DNA-A y el DNA-B, el DNA-Z consta de dos cadenas antiparalelas mantenidas juntas por los pares de bases de Watson-Crick. Aparte de estas características, el DNA-Z es bastante diferente. La hélice levógira tiene un diámetro de 18 Å (1,8 nm), contiene 12 pares de bases por vuelta y adquiere una conformación en zigzag (de ahí su nombre). El surco mayor, presente en el DNA-B, está casi eliminado en el DNA-Z.

Más recientemente investigaciones realizadas por Jean-François Allemand y sus colaboradores han demostrado que si se estira artificialmente el DNA, esta molécula adquiere otra forma denominada **DNA-P** (llamada así en memoria de Linus Pauling). La comparación entre el modelo de DNA-P y DNA-B es bastante interesante puesto que éste es más largo y estrecho, y los grupos fosfato, que en el DNA-B se encuentran en el exterior, se hallan en el interior de la molécula. Las bases



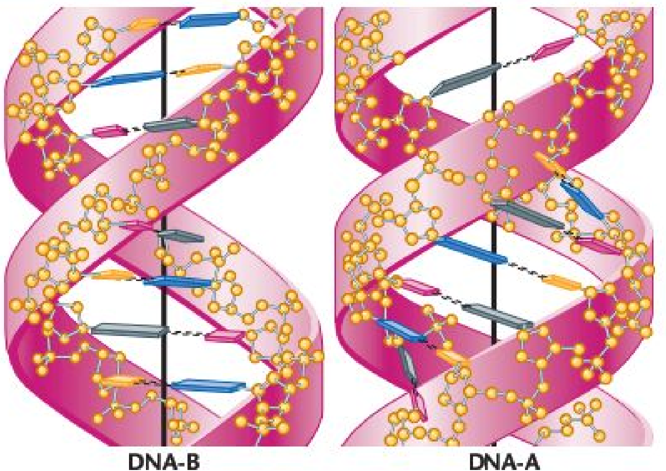


FIGURA 10.17 La mitad superior de la figura muestra modelos generados por ordenador del DNA-B (izquierda), DNA-A (centro) y DNA-Z (derecha). Debajo hay una representación artística que esquematiza la orientación de los pares de bases en el DNA-B y en el DNA-A. (Obsérvese que los pares de bases del DNA-B están dispuestos perpendicularmente a la hélice, mientras que en el DNA-A están inclinados y desplazados de la hélice).

nitrogenadas, que en el DNA-B se encuentran en el interior de la hélice, en el DNA-P se hallan cerca de la superficie externa de la hélice, y presenta 2,62 bases por vuelta, en comparación con las 10,4 del DNA-B.

El interés por las formas alternativas de DNA, como la Z y la P, surge de la idea que el DNA podría tener que adquirir estructuras distintas a la forma B como parte de su función como material genético. Tanto durante la replicación como durante la transcripción (cuando se sintetiza su complemento de RNA durante la expresión génica), las cadenas de la hélice deben separarse y ser accesibles a enzimas de gran tamaño y a una gran variedad de otras proteínas implicadas en estos procesos. Es posible que cambios en la forma del DNA faciliten estas funciones. Conformaciones específicas pueden servir de puntos de reconocimiento molecular para las proteínas. Sin embargo, la verificación de la importancia biológica de las formas alternativas aguarda la demostración de que existen *in vivo*.

Ahora resuelva esto

El Problema 10.36 de la página 300 le pide que analice un DNA cuyo origen ha sido recientemente descubierto.

Sugerencia: Para empezar, conocer la naturaleza y la composición relativa de las bases nitrogenadas del DNA desconocido le proporcionará información experimental especialmente importante.

10.9 La estructura del RNA es químicamente parecida a la del DNA, pero de cadena sencilla

La segunda categoría de ácidos nucleicos es el ácido ribonucleico, o RNA. La estructura de estas moléculas es similar a la del DNA, pero con varias excepciones importantes. Aunque el RNA también tiene por piezas a nucleótidos unidos en cadenas de polinucleótidos, el azúcar ribosa reemplaza a la desoxirribosa y la base nitrogenada uracilo reemplaza a la timina. Otra diferencia importante es que la mayor parte del RNA es de cadena sencilla, aunque hay dos excepciones importantes. En primer lugar, algunas veces las moléculas de RNA de pliegan sobre sí mismas para formar regiones de doble cadena de pares de bases complementarias. Segundo, algunos virus animales que tienen RNA como material genético lo presenten en forma de hélices de doble cadena. De este modo, hay varios ejemplos en los que el RNA no es una molécula estrictamente lineal y de cadena sencilla.

Hay tres clases principales de moléculas de RNA celular que funcionan durante la expresión de la información genética: **RNA ribosómico (rRNA)**, **RNA mensajero (mRNA)** y **RNA transferente (tRNA)**. Todas estas moléculas se originan como copias complementarias de una de las dos cadenas de DNA durante el proceso de la transcripción. Es decir, su secuencia nucleotídica es complementaria a la secuencia de desoxirribonucleótidos del DNA, que sirve de molde para su síntesis. Como en el RNA el uracilo reemplaza a la timina, éste es el complementario de la adenina durante la transcripción y durante el emparejamiento de bases en el RNA.

La Tabla 10.4 caracteriza las principales formas de RNA que se encuentran en las células procariotas y eucariotas. Los diferentes RNAs se distinguen por su comportamiento de sedimentación en un campo centrífugo y por su tamaño, medido según el número de nucleótidos que contiene. El comportamiento de sedimentación depende de la densidad, la masa y la forma, y se mide en unidades que designan el **coeficiente de Svedberg** (*S*) de la molécula. Aunque valores altos de *S* casi siempre designan moléculas de alto peso molecular, la correlación no es directa; es decir, un incremento al doble del peso molecular no conlleva un incremento al doble de *S*. Esto se debe a que además de la masa de la molécula, su tamaño y su forma

TABLA 10.4 CARACTERIZACIÓN DEL RNA

Tipo de RNA	% respecto RNA* total	Componentes (coeficiente de Svedberg)	Eucariótico (E) o procariótico (P)	Número de nucleótidos
RNA ribosómico (rRNA)	80	5*S*	P y E	120
		5,8*S*	E	160
		16*S*	P	1.542
		18*S*	E	1.874
		23*S*	P	2.904
		28*S*	E	4.718
RNA de transferencia (tRNA)	15	4*S*	P y E	75-90
RNA mensajero (mRNA)	5	diverso	P y E	100-10.000

*En *E. coli*

Estructura molecular de los ácidos nucleicos: la estructura del ácido desoxirribonucleico*

Queremos sugerir una estructura de la sal del ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta estructura tiene características nuevas con un considerable interés biológico. Pauling y Corey ya han propuesto una estructura de los ácidos nucleicos[1]. Estos autores nos han proporcionado amablemente su manuscrito antes de su publicación. Su modelo consiste en tres cadenas enrolladas entre sí, con los fosfatos localizados cerca del eje de la fibra, y con las bases en el exterior. En nuestra opinión, esta estructura no es satisfactoria por dos motivos. (1) Creemos que el material que genera los patrones de rayos X es la sal, no el ácido libre. Sin los átomos ácidos del hidrógeno no queda claro qué fuerzas mantendrán junta la estructura, sobretodo debido a que los fosfatos cargados negativamente cercanos al eje se repelerán unos a otros. (2) Algunas de las distancias de van der Waals parecen ser demasiado pequeñas.

Fraser ha sugerido otra estructura tricatenaria (en prensa). En su modelo, los fosfatos están en el exterior y las bases en el interior, unidas entre sí por puentes de hidrógeno. Esta estructura descrita está poco definida, y por este motivo no comentaremos nada sobre ella.

Queremos proponer una estructura de la sal del ácido desoxirribonucleico radicalmente diferente. Esta estructura tiene dos cadenas helicoidales enrolladas alrededor de un mismo eje. Hemos hecho las suposiciones químicas normales, es decir, que cada cadena consiste de grupos fosfodiéster que unen residuos de b-D-desoxirribofuranosa con uniones 3', 5'. Las dos cadenas (pero no sus bases) forman un dúplex perpendicular al eje de la fibra. Ambas cadenas son dextrógiras, pero las secuencias de átomos de las dos cadenas del dúplex discurren en direcciones opuestas. Cada cadena se asemeja, en sentido amplio, al modelo nº 1 de Furberg[2]: es decir, las bases están en el interior de la hélice y los fosfatos en el exterior. La configuración de los azúcares y de los átomos cercanos se parece a la «configuración normal» de Furberg, de manera que el azúcar es aproximadamente perpendicular a la base a la que está unido. En cada cadena, hay un residuo cada 3,4 Å en la dirección z. Hemos supuesto un ángulo de 36° entre residuos adyacentes de la misma cadena, de manera que la estructura se repite tras 10 residuos de cada cadena, es decir, después de 34Å. La distancia de un átomo de fósforo al eje de la fibra es de 10Å. Puesto que los fosfatos están en el exterior, los cationes pueden acceder fácilmente a ellos.

La estructura es abierta y el contenido en agua es más bien elevado. Si tuviese un contenido menor de agua esperaríamos que las bases se inclinasen de manera que la estructura sería más compacta.

La característica nueva de esta estructura es la manera en que las dos cadenas se mantienen unidas mediante las purinas y las pirimidinas. Los planos de las bases son perpendiculares al eje de la fibra. Están unidos en parejas: una base de una cadena está unida mediante puentes de hidrógeno a una base de la otra cadena, de manera que ambas yacen de lado con la misma ordenación z. En cada pareja, para que se formen los puentes, una debe ser una puirina y la otra una pirimidina. Los puentes de hidrógeno se establecen de la siguiente manera: la purina en posición 1 con la pirimidina en posición 1; la purina en posición 6 con la pirimidina en posición 6.

Si se asume que, en esta estructura, las bases sólo se encuentran en sus formas tautoméricas más plausibles (es decir, con las configuraciones ceto y no con las enol), se encuentra que sólo pueden formarse pares de bases específicos. Estos pares son: adenina (purina) con timina (pirimidina), y guanina (purina) con citosina (pirimidina).

Dicho de otra manera, y según esta suposición, si uno de los miembros del par en cualquiera de las dos cadenas es una adenina, el otro miembro debe ser una timina; lo mismo sucede con una guanina y una citosina. La secuencia de bases de una sola cadena no parece estar restringida de ninguna manera. Sin embargo, si sólo pueden formarse pares de bases específicos, para una secuencia de bases dada en una cadena, la secuencia de bases de la otra cadena queda automáticamente determinada.

Experimentalmente se ha encontrado[3,4] que, en el ácido desoxirribonucleico, la relación de la cantidad de adenina y de timina y la relación de guanina y de citosina son siempre muy cercanas a la unidad.

Probablemente es imposible construir esta estructura con el azúcar ribosa en lugar del desoxirribosa, puesto que el átomo de oxígeno extra haría un contacto de van der Waals demasiado cercano.

Los datos publicados de rayos X [5,6] del ácido desoxirribonucleico son insuficientes para probar rigurosamente nuestra estructura. Todo lo que podemos decir es que es compatible, a grandes rasgos, con los datos experimentales, pero debe considerarse como aún no comprobado hasta que se haya comparado con resultados más exactos. Algunos de estos se darán en próximas comunicaciones. Cuando diseñamos nuestra estructura no tuvimos mucho en cuenta los detalles de los resultados presentados, que se apoyan principalmente, aunque no completamente, en datos experimentales publicados y en argumentos estereoquímicos.

No se nos ha escapado que el emparejamiento de bases que hemos postulado sugiere inmediatamente un posible mecanismo de copia del material genético.

Los detalles completos de la estructura, incluyendo las condiciones supuestas al construirla, junto con un grupo de ordenaciones de los átomos, se publicarán en otra parte.

Estamos en deuda con el Dr. Jerry Donohue por sus constantes consejos y críticas, especialmente en las distancias interatómicas. También nos hemos visto estimulados por las nociones generales de los resultados experimentales no publicados y por las ideas del Dr. M. H. F. Wilkins, el Dr. R. E. Franklin y por sus colaboradores del King's College, de Londres. Uno de nosotros (J. D. W.) tiene una beca de la National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. Watson
F. H. C. Crick

Referencias

Medical Research Council Unit of the molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge, England.

[1] Pauling, L., and Corey, R. B. Nature, 171, 346 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci*, 39, 84 (1953).
[2] Furberg, S.., *Acta Chem. Scand.*, 6, 634 (1952)
[3] Chargaff, E., para referencias véase Zamenhof, S. Brawerman, G., and Chargaff, E.,, *Biochim. et Biophys. Acta*, 9, 402 (1952).
[4] Wyatt, G. R. *Gen. Physiol.*, 36, 201 (1952).
[5] Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol. 1, Nucleic Acid*, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).
[6] Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 192 (1953).

Fuente: J. D. Watson and F. H. C. Crick, «Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid». Reimpreso con permiso de *Nature*, vol. 171, n.º 4356, pp. 737-38.

* *Nota del traductor:* para los lectores interesados en conocer los términos exactos utilizados por J. D. Watson y por F. H. C. Crick para describir la estructura del DNA, la referencia del artículo original se encuentra en la sección «Lecturas seleccionadas».

también afectan la tasa de sedimentación (*S*). Como se puede ver, hay una amplia variación en el tamaño de los tres tipos de RNA.

En general, el RNA ribosómico es la mayor de estas moléculas (como generalmente refleja su valor *S*) y suele constituir, aproximadamente, el 80 por ciento del RNA total en una célula de *E. coli*. El RNA ribosómico es un componente estructural importante de los **ribosomas**, que funcionan como una mesa de trabajo inespecífica para la síntesis de proteínas durante el proceso de traducción. Las diversas formas de rRNA que se encuentran en procariotas y en eucariotas se diferencian inequívocamente por su tamaño.

Las moléculas de RNA mensajero transportan la información genética desde el DNA del gen hasta el ribosoma, donde se produce la traducción. Su longitud varía considerablemente, lo que refleja la variación del tamaño de la proteína codificada por el mRNA y del gen que sirve de molde para la transcripción de esta molécula. Aunque la Tabla 10.4 muestra que en *E. coli* el 5% del RNA es mRNA, este porcentaje varía entre células e incluso entre momentos diferentes de la vida de una misma célula.

El RNA transferente, que representa hasta el 15% en un célula típica, es la clase más pequeña de moléculas de RNA, y es la encargada de transportar los aminoácidos hasta los ribosomas durante la traducción. Este menor tamaño facilita que más de una molécula de tRNA interaccione simultáneamente con el ribosoma.

En los Capítulos 13 y 14 trataremos con más detalle las funciones de las tres clases de RNA. Además, a medida que prosigamos, encontraremos otros tipos de RNA que realizan diversas funciones. Por ejemplo, los **RNA nucleares pequeños** (**snRNA**, del inglés *small nuclear RNA*), que participan en el procesamiento de los mRNA. La **RNA telomerasa** está implicada en la replicación del DNA en los extremos de los cromosomas (Capítulo 11), y el **RNA antisentido** y el **RNA de interferencia corto** (**siRNA**, del inglés short interfering RNA) están implicados en la regulación génica (Capítulo 17). En esta sección, nuestra intención ha sido comparar la estructura del DNA, que almacena la información genética, con la del RNA, que ejerce su función durante la expresión de la información.

10.10 Muchas técnicas analíticas han sido útiles durante la investigación del DNA y el RNA

Desde 1953, se ha clarificado la función del DNA como material genético y la del RNA en la transcripción y la traducción mediante análisis detallados de los ácidos nucleicos. En este capítulo consideraremos varios métodos de análisis de estas moléculas.

Absorción de luz ultravioleta (UV)

Los ácidos nucleicos presentan una mayor absorción de luz ultravioleta (UV) a 254-260 nm de longitud de onda (Figura 10.7) debido a la interacción entre la luz UV y los sistemas anulares de las purinas y de las pirimidinas. De este modo, cualquier molécula que contenga bases nitrogenadas (p.e., nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos) puede analizarse usando luz UV. Esta técnica es especialmente importante para la localización, separación y caracterización de los ácidos nucleicos.

El análisis ultravioleta se utiliza junto a otros muchos protocolos establecidos para separar moléculas. Como veremos en la próxima sección, el uso de la absorción de UV es importante para aislar ácidos nucleicos después de separarlos.

Comportamiento de sedimentación

Las mezclas de ácidos nucleicos se pueden separar sometiéndolas a uno o a varios de los posibles procedimientos de centrifugación (Figura 10.18). La mezcla se puede cargar en la parte superior de una solución preparada para que forme, entre la parte superior y la inferior, un gradiente de concentración. Luego, se centrifuga esta mezcla a altas revoluciones en una ultracentrífuga. La mezcla de moléculas emigrará hacia abajo, moviéndose cada componente a una velocidad diferente. La centrifugación se detiene y se eluye el gradiente del tubo. Entonces se mide la absorción a 260 nm de cada fracción con un espectrofotómetro. De esta manera, se puede determinar la posición inicial de una fracción de ácido nucleico a lo largo del gradiente, y pudiéndose aislar y estudiar la fracción.

El gradiente de centrifugación descrito se basa en el comportamiento de sedimentación de las moléculas en solución. Para el análisis de ácidos nucleicos se emplean dos tipos principales de técnicas de gradiente de centrifugación: el equilibrio de sedimentación y la velocidad de sedimentación. Ambas requieren el uso de centrífugas de alta velocidad para crear grandes fuerzas centrífugas sobre las moléculas en un gradiente.

En la **centrifugación por equilibrio de sedimentación** (llamada a veces centrifugación en un gradiente de densidad), se crea un gradiente de densidad que se solapa con las densidades de los componentes individuales de la mezcla de moléculas. Normalmente, el gradiente se elabora con una sal metálica pesada como el cloruro de cesio (CsCl). Durante la centrifugación, las moléculas emigran hasta que alcanzan un punto de densidad de flotación neutra. En este momento, la fuerza centrífuga sobre ellas es igual y opuesta a la fuerza de difusión ascendente, por lo que dejan de emigrar. Si se usa DNA de diferentes densidades, éstos se separarán a medida que las moléculas de cada densidad alcanzan el equilibrio con la correspondiente densidad de CsCl. El gradiente puede fraccionarse y los componentes pueden aislarse (Figura 10.18). Si se realiza adecuadamente, esta técnica proporciona una alta resolución que permite separar mezclas de moléculas cuya densidad varíe sólo ligeramente.

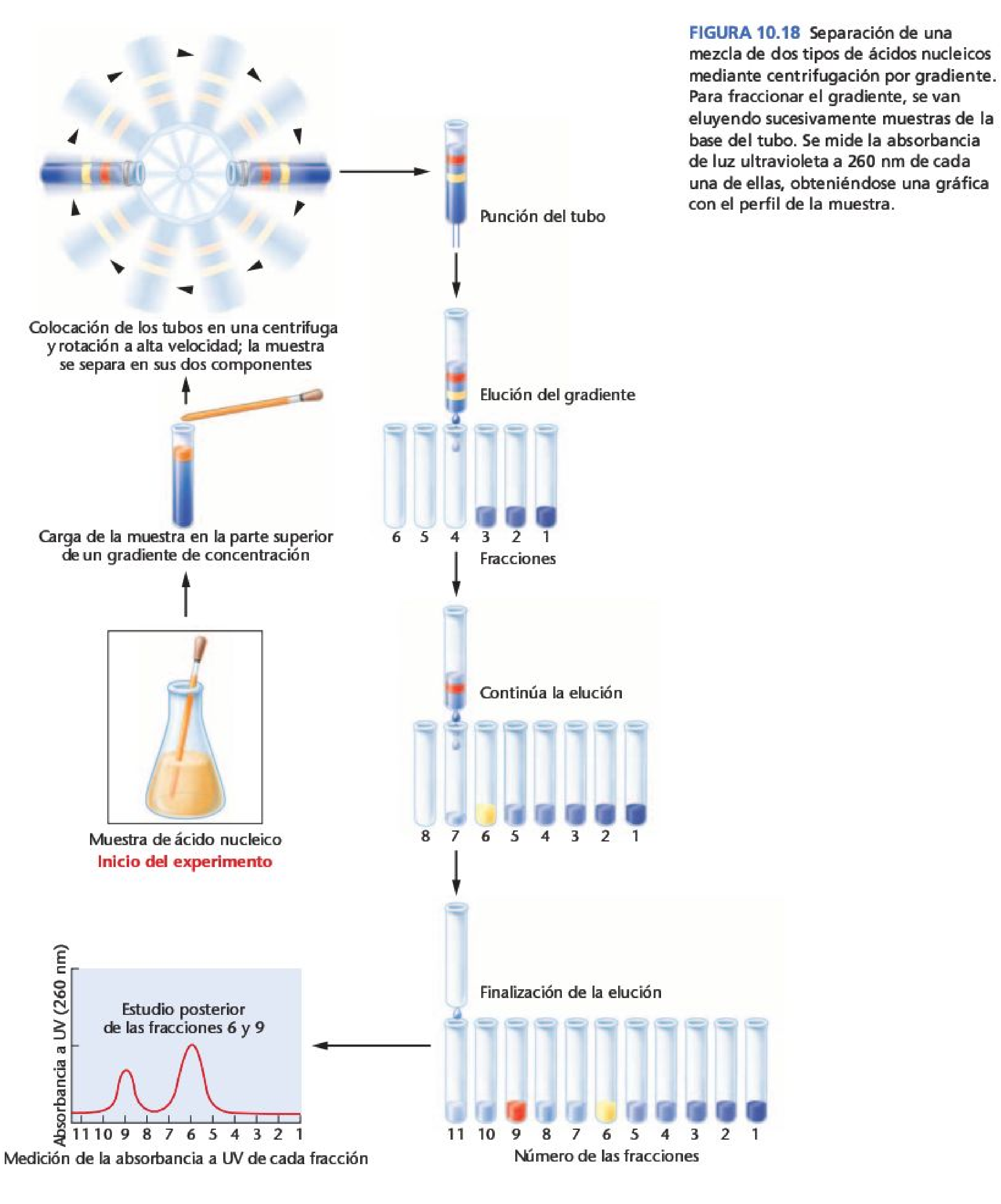


FIGURA 10.18 Separación de una mezcla de dos tipos de ácidos nucleicos mediante centrifugación por gradiente. Para fraccionar el gradiente, se van eluyendo sucesivamente muestras de la base del tubo. Se mide la absorbancia de luz ultravioleta a 260 nm de cada una de ellas, obteniéndose una gráfica con el perfil de la muestra.

Los estudios de centrifugación por equilibrio de sedimentación también pueden utilizarse para obtener datos de la composición de bases de un DNA de doble cadena. Los pares de bases G≡C son más compactos y densos que los A═T. Como se muestra en la Figura 10.19, el porcentaje de pares de G≡C en el DNA es directamente proporcional a la densidad de flotación de la molécula. Utilizando esta técnica, podemos hacer una útil caracterización molecular del DNA de diferentes orígenes.

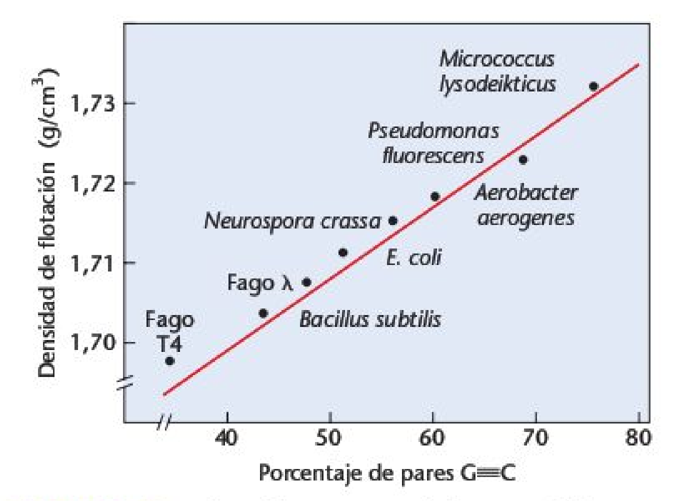


FIGURA 10.19 Gráfica del porcentaje de los pares de bases guanina-citosina (G≡C) en el DNA respecto a la densidad de flotación en diversos organismos.

La segunda técnica, la **centrifugación por velocidad de sedimentación**, utiliza una centrífuga analítica que permite seguir las emigraciones de las moléculas durante la centrifugación mediante un sistema óptico de absorción de luz ultravioleta. De este modo, puede determinarse la «velocidad de sedimentación». La velocidad de sedimentación se mide en unidades llamadas coeficiente de Svedberg (*S*), como ya se ha mencionado anteriormente.

En esta técnica, las moléculas se cargan en la parte superior del gradiente, y las fuerzas gravitatorias creadas por centrifugación las conducen hacia la base del tubo. Dos fuerzas actúan contra este movimiento descendente: (1) la resistencia de fricción creada por la viscosidad de la solución; y (2) parte de la fuerza de difusión, que se dirige hacia arriba. Bajo estas condiciones, las variables clave son la masa y forma de las moléculas a examinar. En general, a mayor masa, mayor velocidad de sedimentación. Sin embargo, la forma de la molécula afecta la resistencia de fricción. Por lo tanto, dos moléculas de igual masa pero diferente forma sedimentarán a velocidades diferentes.

Una de las utilidades de la técnica de velocidad de sedimentación es la determinación del **peso molecular** (**MW**, del inglés *molecular weight*). Si se conocen determinadas propiedades físico-químicas de la molécula a estudiar, se puede calcular el MW basado en la velocidad de sedimentación. El valor *S* incrementa con el peso molecular, pero no es directamente proporcional a él.

Desnaturalización y renaturalización de los ácidos nucleicos

Cuando se produce la **desnaturalización** de un DNA de doble cadena, se rompen los puentes de hidrógeno de la estructura dúplex, ésta se desenrolla, y las cadenas se separan. Sin embargo, los enlaces covalentes no se rompen. Durante la separación de las cadenas, que puede inducirse por calor o mediante tratamientos químicos, decrece la viscosidad del DNA, y tanto la absorción de UV como la densidad de flotación aumentan. La desnaturalización por calor es llamada a veces fusión. Es fácil medir el incremento de absorción de UV al calentar una solución de DNA, que se denomina **variación hipercrómica**. Este efecto se esquematiza en la Figura 10.20.

Puesto que los pares de bases G≡C tienen un puente de hidrógeno más que los pares A═T, son más estables al tratamiento por calor. Así, un DNA con una mayor proporción de pares G≡C que de pares A═T necesita una temperatura más alta para desnaturalizarse completamente. Cuando se sigue y se representa la absorción a 260 nm (OD_{260}) en función de la temperatura de calentamiento, se obtiene el **perfil de fusión** del DNA. El punto medio de este perfil, o curva, recibe el nombre de **temperatura de fusión** (**T_m**), y representa el punto en que el 50 por ciento de las cadenas están desenrolladas o desnaturalizadas (Figura 10.20). Cuando la curva se aplana a su máxima densidad óptica, la desnaturalización es completa y sólo existen cadenas sencillas. El análisis de los perfiles de fusión proporciona una caracterización del DNA y un método alternativo para estimar su composición de bases.

Uno puede preguntarse si el proceso de desnaturalización puede invertirse; es decir, ¿pueden cadenas sencillas de ácidos nucleicos reconstruir una doble hélice, suponiendo que cada cadena complementaria esté presente? Esto no sólo es así, sino que además esta reasociación suministra la base para varias técnicas analíticas importantes que han proporcionado mucha información valiosa durante la experimentación genética.

Si un DNA desnaturalizado por calor se enfría lentamente, las colisiones aleatorias entre cadenas complementarias harán que éstas se reasocien. A una temperatura adecuada, los puen-

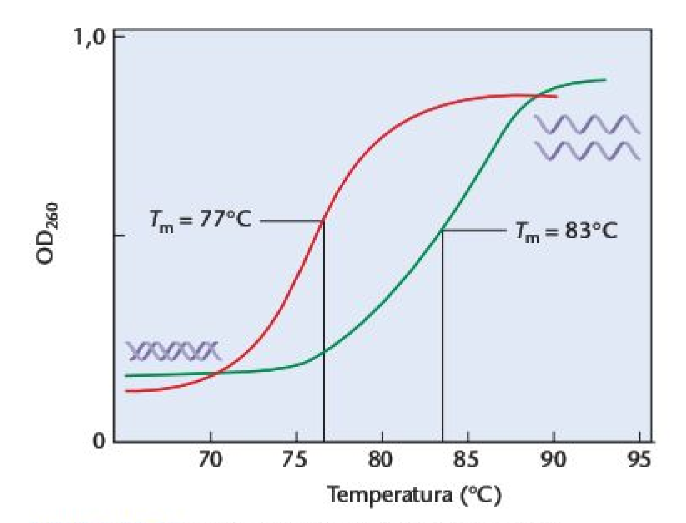


FIGURA 10.20 Comparación del incremento de la absorbancia de UV respecto al incremento de temperatura (efecto hipercrómico) para dos moléculas de DNA con diferente contenido en GC. La molécula con un punto de fusión (T_m) de 83°C tiene un contenido mayor en GC que la molécula con una T_m de 77°C.

tes de hidrógeno se restablecerán, afianzando pares de cadenas en estructuras dúplex. A medida que se va enfriando, se formarán más y más moléculas dúplex. Según las condiciones, no se necesita un completo encaje para que se forme un dúplex, siempre y cuando haya zonas de emparejamiento de bases entre las dos cadenas que se reasocien.

Hibridación molecular

La propiedad de desnaturalización-renaturalización que tienen las cadenas sencillas complementarias de los ácidos nucleicos es la base para una poderosa técnica analítica en genética molecular —la **hibridación molecular**. Esta técnica debe su nombre al hecho de que, para la renaturalización de cadenas sencillas, no es necesario que éstas provengan de una misma fuente de ácidos nucleicos. Por ejemplo, si se aíslan cadenas de DNA de diferentes organismos y entre ellas existe algún grado de complementariedad de bases, durante la renaturalización se formarán híbridos moleculares. Además, si se utilizan mezclas de DNA y RNA de cadena sencilla, éstos también podrán hibridar. Un caso de éstos sería cuando un RNA y el DNA del que se ha transcrito están juntos (Figura 10.21). El RNA encontrará su DNA complementario de cadena sencilla y se renaturalizará. En este ejemplo, las cadenas de DNA se calientan, lo que provoca su separación, y posteriormente se enfrían en presencia de RNA de cadena sencilla. Si el RNA se ha transcrito a partir del DNA usado en el experimento, y por tanto es complementario a él, se producirá hibridación, formándose un dúplex DNA:RNA. Hay varios métodos que permiten hacer el seguimiento de la cantidad de moléculas de doble cadena que se producen después de la separación de las cadenas. Inicialmente se utilizaron radioisótopos para «marcar» una de las cadenas y controlar su presencia en los dúplex híbridos que se formaban.

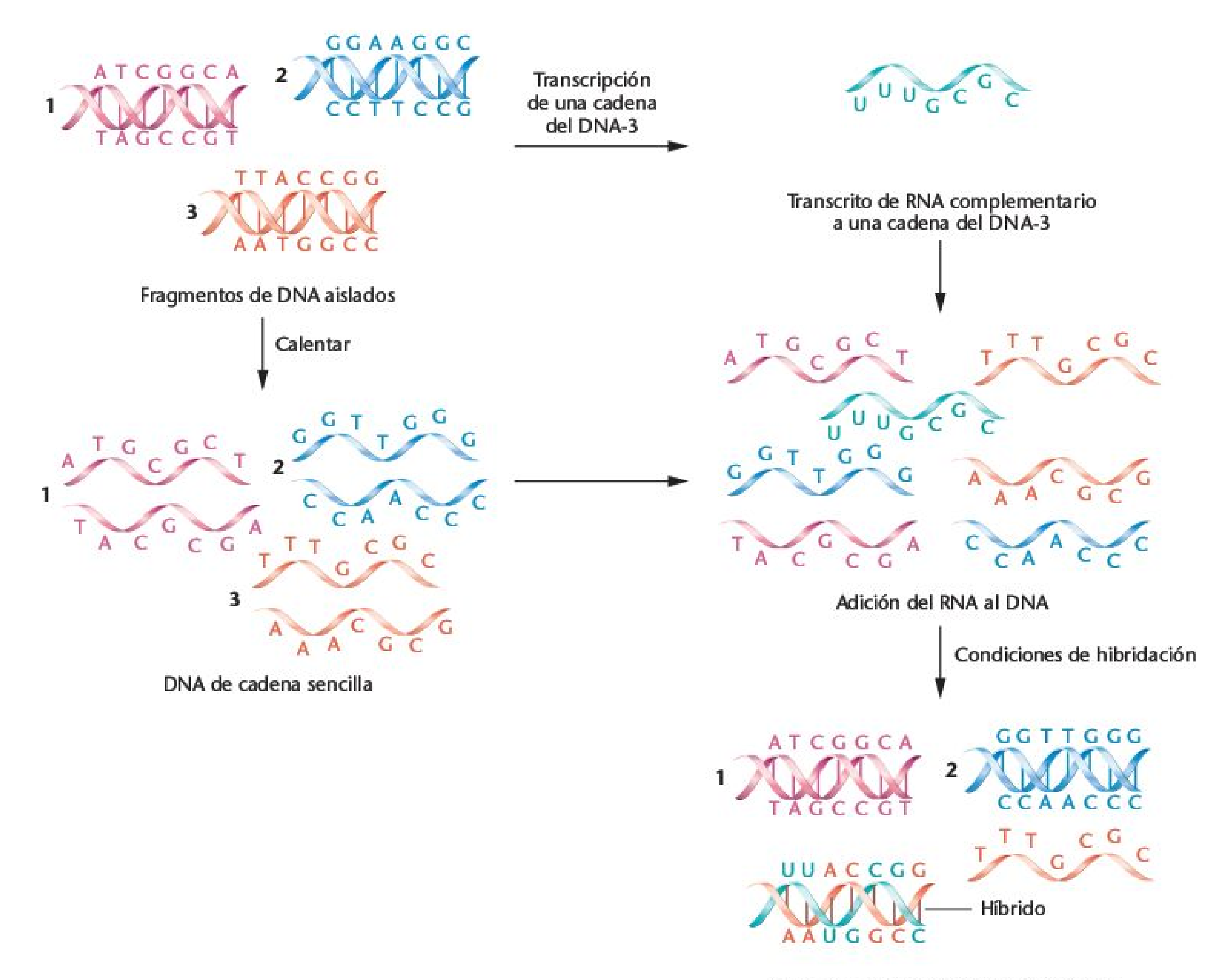


FIGURA 10.21 Representación esquemática del proceso de hibridación molecular entre fragmentos de DNA y de RNA que han sido transcritos a partir de uno de los fragmentos de cadena sencilla.

En la década de los 60, las técnicas de hibridación molecular contribuyeron a aumentar el conocimiento de los fenómenos transcripcionales que ocurren a nivel de los genes. Se han ido produciendo continuos refinamientos de este proceso, que han sido precursores de investigaciones en evolución molecular y en la organización del DNA en los cromosomas. La hibridación puede producirse en solución o bien cuando el DNA está unido a un gel o a un tipo especial de filtros, facilitando así la recuperación de los híbridos recién formados. Dichos filtros se utilizan en diversos **procedimientos de transferencia de DNA**, en los que la hibridación sirve de «sonda» para las secuencias complementarias de ácidos nucleicos. La transferencia se usa de manera rutinaria en los análisis genómicos modernos. Además, la hibridación también se producirá aunque el DNA forme parte de un tejido colocado sobre un portaobjetos, como en el procedimiento FISH (que se trata en la siguiente sección), o cuando se encuentre en un chip de vidrio, la base del **análisis de microcolecciones de DNA**[2] (que se tratan en el Capítulo 22). El análisis de microcolecciones permite el rastreo en masa de genes clonados en un solo ensayo.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

El refinamiento de la técnica de hibridación molecular ha conducido a la utilización del DNA presente en preparaciones citológicas como «diana» para la formación de híbridos. Cuando esta aproximación se combina con la utilización de sondas fluorescentes, la técnica se denomina **hibridación fluorescente *in situ***, o simplemente **FISH** (del inglés *fluorescent in situ hybridisation*). En este protocolo, se fijan células mitóticas o interfásicas a un portaobjetos y se someten a condiciones de hibridación. Se añade DNA de cadena sencilla o RNA, y se detecta la hibridación. El ácido nucleico sirve de «sonda», ya que solo hibridará con las áreas específicas del cromosoma para las que es complementario. Antes de que se refinase la utilización de sondas fluorescentes, en estos procedimientos se usaban sondas radioactivas para permitir su detección sobre el portaobjetos. En esta aproximación se utilizaba la técnica de autorradiografía.

Las sondas fluorescentes se preparan de la siguiente manera. Cuando se utiliza DNA, éste se une a una molécula orgánica pequeña llamada biotina (creándose DNA biotinilado). Una vez se ha realizado la hibridación *in situ*, se utiliza otra molécula que tiene una gran afinidad para unirse a la biotina (avidina o estreptavidina). La avidina (o estreptavidina) está unida a una molécula fluorescente, como la fluoresceína, y este complejo se hace reaccionar con la preparación citológica. Este método es extremadamente sensible para la localización del DNA hibridado.

La Figura 10.22 muestra el uso de FISH para identificar DNA específico de los centrómeros de cromosomas humanos. La resolución del FISH es suficientemente grande como para detectar un solo gen entre una dotación completa de cromosomas. La utilización de esta técnica para identificar localizaciones cromosómicas que albergan información genética específica ha supuesto una adición valiosa al repertorio de los genéticos experimentales.

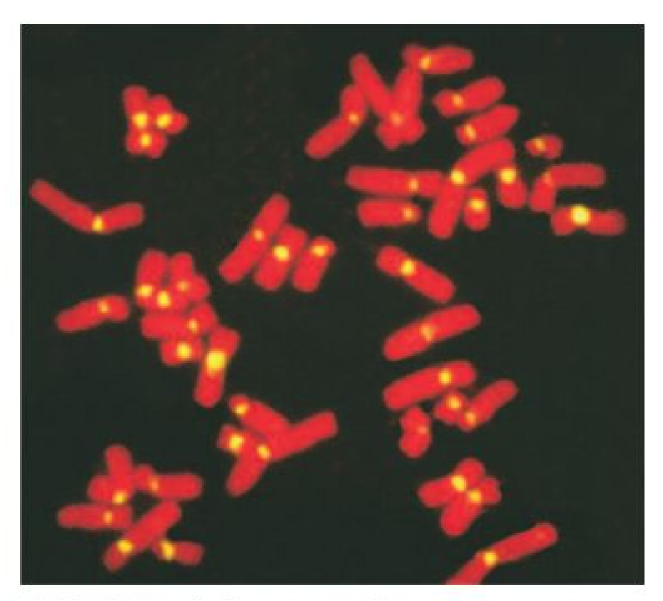


FIGURA 10.22 Hibridación *in situ* de cromosomas metafásicos humanos mediante la técnica fluorescente (FISH). La sonda, específica de DNA centromérico, produce una señal fluorescente amarilla que indica hibridación. La fluorescencia roja se produce por una tinción de contraste del DNA cromosómico con yoduro de propidio.

Cinética de reasociación y DNA repetitivo

Una extensión de los protocolos de hibridación molecular es la técnica que mide la tasa de reasociación de cadenas complementarias de DNA provenientes de una misma fuente. Esta técnica, denominada **cinética de reasociación**, fue refinada y estudiada inicialmente por Roy Britten y David Kohne.

Para estas investigaciones, primero se fragmenta el DNA en pequeños trozos aplicando fuerzas de agitación durante su aislamiento. Los fragmentos de DNA resultantes se agrupan alrededor de un tamaño medio uniforme de varios cientos de pares de bases. Posteriormente, estos fragmentos de DNA se disocian por calor en cadenas sencillas. Después, se disminuye la temperatura y se detecta la reasociación. Durante la reasociación, trozos de DNA de cadena sencilla colisionan al azar. Si son complementarios se forma una doble cadena estable; si no, se separan y quedan libres para encontrar otro fragmento de DNA. El proceso continúa hasta que se han hecho todos los emparejamientos.

En la Figura 10.23 se presentan los resultados de un experimento como éste. En una gràfica se representa el porcentaje de reasociación de los fragmentos de DNA respecto a una escala logarítmica del producto inicial C_0 (concentración de cadenas sencillas de DNA en moles de nucleótidos por litro), y t

[2] *Nota del traductor:* también se suelen denominar **microchips de DNA** o con el vocablo inglés ***microarray***.

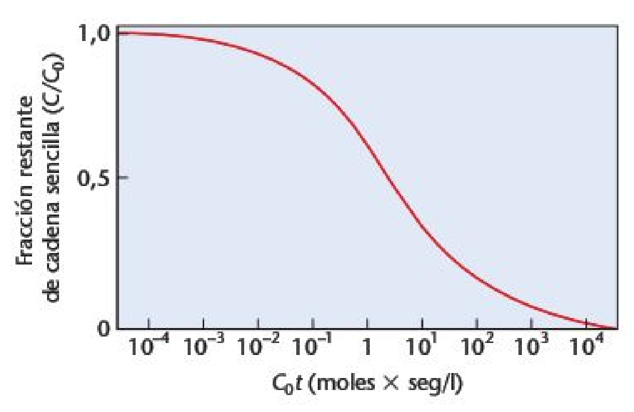


FIGURA 10.23 Idealización del tiempo de reasociación del DNA (C/C_0) cuando, a tiempo cero, todo el DNA consiste en fragmentos únicos complementarios de cadena sencilla. Obsérvese que la abcisa (C_0t) está representada logarítmicamente.

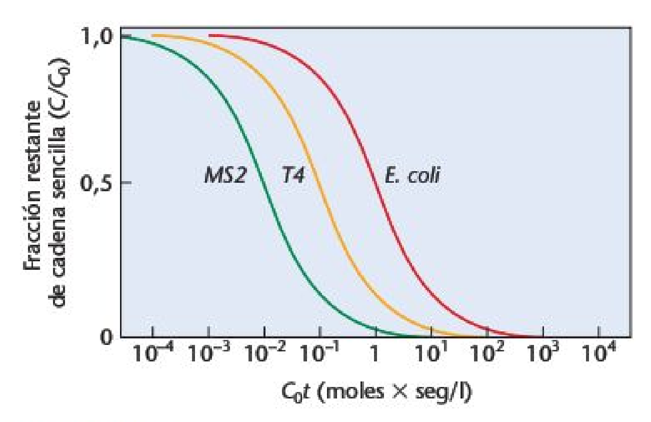


FIGURA 10.24 Comparación de la tasa de reasociación (C/C_0) de DNA proveniente del fago MS-2, del fago T4 y de *E. coli*. El genoma de T4 es mayor que el de MS-2, y el de *E. coli* es mayor que el de T4.

(tiempo, medido en minutos). El proceso de renaturalización sigue una relación cinética de segundo orden de acuerdo con la ecuación

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t}$$

donde C es la concentración de DNA de cadena sencilla que queda después de haber pasado el tiempo t, y k es la constante de relación cinética de segundo orden. Inicialmente, C es igual a C_0, y la fracción de cadena sencilla que queda es del 100 por ciento.

La forma inicial de la curva refleja el hecho de que en una mezcla de fragmentos de secuencia única, cada uno con un complementario, los emparejamientos iniciales tardan más tiempo en producirse. Luego, como muchas cadenas sencillas se han convertido en dúplex, los emparejamientos se producen más rápidamente, lo que queda reflejado en un incremento en la «pendiente» de la curva. Hacia el final de la reacción, las pocas cadenas sencillas que quedan necesitan más tiempo para hacer los emparejamientos finales.

Se puede obtener una gran cantidad de información comparando el DNA de diferentes organismos. Por ejemplo, podemos comparar el punto de la reacción en el que la mitad del DNA está en forma de fragmentos de doble cadena. Este punto se denomina $C_0t_{1/2}$, o *tiempo medio de reacción*. Si todos los pares complementarios de DNA de cadena sencilla están formados por secuencias únicas de nucleótidos y tienen aproximadamente el mismo tamaño, $C_0t_{1/2}$ varía proporcionalmente a la complejidad del DNA. La complejidad, designada con la letra X, representa la longitud, en pares de nucleótidos, entre los extremos de cualquier fragmento único de DNA. Si el DNA utilizado en un experimento representa el genoma completo, y si todas las secuencias de DNA son diferentes entre ellas, X es igual al tamaño del genoma haploide.

La Figura 10.24 muestra el resultado que se obtiene al comparar DNA de dos bacteriófagos distintos y de una bacteria, cada uno con un genoma de diferente tamaño. Como puede verse, a medida que se incrementa el tamaño del genoma, las curvas que se obtienen se desplazan más y más hacia la derecha, indicando un incremento en el tiempo de reasociación.

Como se muestra en la Figura 10.25, $C_0t_{1/2}$ es directamente proporcional al tamaño del genoma. En los genomas más grandes la reasociación se produce a una tasa más lenta puesto que si el número de fragmentos únicos de DNA es mayor se tarda más en que se produzcan los emparejamientos iniciales. Esto es así puesto que las colisiones se producen al azar; a mayor número de secuencias presentes, más colisiones erróneas habrá antes de que se produzcan todos los emparejamientos correctos. Este método ha sido útil para determinar el tamaño del genoma en virus y bacterias.

Cuando se estudió por primera vez la cinética de reasociación en organismos eucariotas (cuyo tamaño genómico es mucho mayor que en fagos y bacterias), el resultado fue sorprendente. En vez de observarse una reducción de la tasa de re-

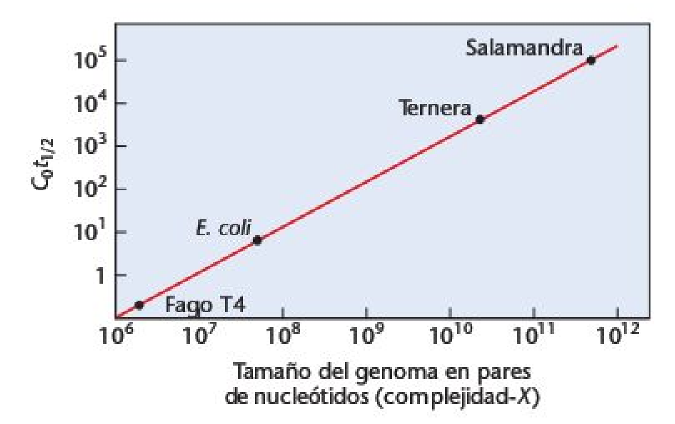


FIGURA 10.25 Comparación del valor $C_0t_{1/2}$ respecto al tamaño del genoma en el fago T4, *E. coli*, ternera y salamandra.

asociación, los datos mostraron que *algunos* segmentos de DNA se reasociaban incluso con más rapidez que los fragmentos de *E. coli*. El resto del DNA, como se esperaba por su mayor complejidad, tardó más en reasociarse. Por ejemplo, Britten y Kohne examinaron DNA de timo de ternera (Figura 10.26). Basándose en estas observaciones, supusieron que la fracción que se reasocia rápidamente debe representar **secuencias repetitivas de DNA**, presentes muchas veces en el genoma de ternera. Esta interpretación explicaría porqué estos segmentos de DNA se reasocian tan rápidamente. Por otro lado, supusieron que el resto de segmentos del DNA consta de secuencias nucleotídicas únicas presentes sólo una vez en el genoma; puesto que hay más de estas secuencias únicas, incrementa la complejidad del DNA en el timo de ternera (comparado con *E. coli*), y el tiempo de reasociación es superior. A la Figura 10.26 se le ha añadido la curva de *E. coli* para su comparación.

Actualmente se sabe que las secuencias de DNA repetido predominan en el genoma de los eucariotas, y son clave para entender como se organiza la información genética en los cromosomas. Cuando se analiza cuidadosamente, se hace aparente que existen varios niveles de repetición. Se conocen casos en que secuencias cortas de DNA están repetidas más de un millón de veces, mientras que otras secuencias más largas están repetidas sólo unas pocas veces, existiendo también niveles intermedios de redundancia en las secuencias. En el Capítulo 12 volveremos a tratar este tema, en el que abordaremos la organización del DNA en genes y en cromosomas. Por ahora, concluimos esta discusión sobre las secuencias de DNA repetitivo indicando que el descubrimiento del este DNA fue una de las primeras pistas de que gran parte del DNA de los eucariotas no está contenido en genes que codifican proteínas. Este concepto se desarrollará y elaborará con más profundidad a medida que aumentemos nuestro conocimiento de las bases moleculares de la herencia.

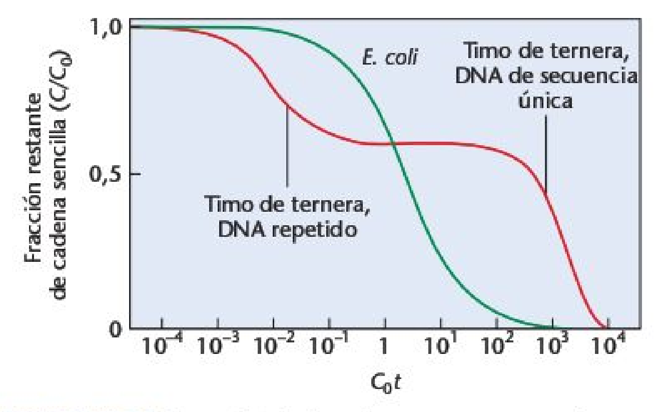


FIGURA 10.26 Curva C_0t de timo de ternera comparada con la de *E. coli*. La fracción repetida del DNA de ternera se reasocia más rápidamente que el DNA de *E. coli*, mientras que el DNA de secuencia única de ternera, más complejo, tarda más en reasociarse que el de *E. coli*.

Ahora resuelva esto

El Problema 10.30 de la página 299 le pide que extrapole el tamaño total de una molécula de DNA a partir de la información de un análisis C_0t.

Sugerencia: Los valores absolutos de C_0t son directamente proporcionales al número de pares de bases que forman una molécula de DNA.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Concluiremos este capítulo tratando una de las técnicas más importantes implicadas en el análisis de los ácidos nucleicos, la **electroforesis**. Esta técnica separa fragmentos de DNA y cadenas de RNA de distinto tamaño, y es insustituible en los trabajos de investigación actuales en genética molecular.

En general, la electroforesis separa, o *resuelve*, moléculas de una mezcla haciéndolas migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. Se coloca la muestra en una sustancia porosa (un trozo de papel de filtro o un gel semisólido), que a su vez se coloca en una solución conductora de electricidad. Si dos moléculas tienen aproximadamente la misma forma *y* masa, la que tenga una mayor carga neta migrará más rápidamente hacia el electrodo de polaridad opuesta.

A medida que se desarrolló esta técnica, aplicada inicialmente a la separación de proteínas, se descubrió que, usando geles de distinto tamaño de poro la resolución de esta técnica de investigación mejoraba de manera significativa. Este avance fue especialmente útil para separar moléculas con una relación carga:masa similar, pero de tamaños diferentes. Por ejemplo, dos cadenas polinucleotídicas de *longitud* diferente (p.e. 10 nucleótidos *vs.* 20), están cargadas negativamente debido al grupo fosfato de los nucleótido. Ambas cadenas se mueven hacia el polo positivo (el ánodo), pero como la relación carga:masa es la misma para ambas, la separación basada estrictamente en el campo eléctrico es mínima. Sin embargo, el uso de medios porosos como los **geles de poliacrilamida** o los **geles de agarosa**, que pueden prepararse con distinto tamaño de poro, permite que estas dos moléculas se separen.

En estos casos, *las moléculas más pequeñas migran a través del gel a una velocidad mayor que las más grandes* (Figura 10.27). La clave de la separación está en la matriz (los poros) del gel, que restringe más la migración de las moléculas grandes que la migración de las moléculas pequeñas. El poder de resolución es tan grande que pueden separarse con claridad polinucleótidos que se diferencian por un solo nucleótido de longitud. Cuando finaliza la electroforesis, las bandas de las moléculas de distinto tamaño se identifican por autorradiografía (si uno de los componentes de la molécula es radioactivo), o mediante un colorante fluorescente que se une a los ácidos nucleicos.

La separación electroforética de los ácidos nucleicos es el núcleo central de diversas técnicas de investigación de uso

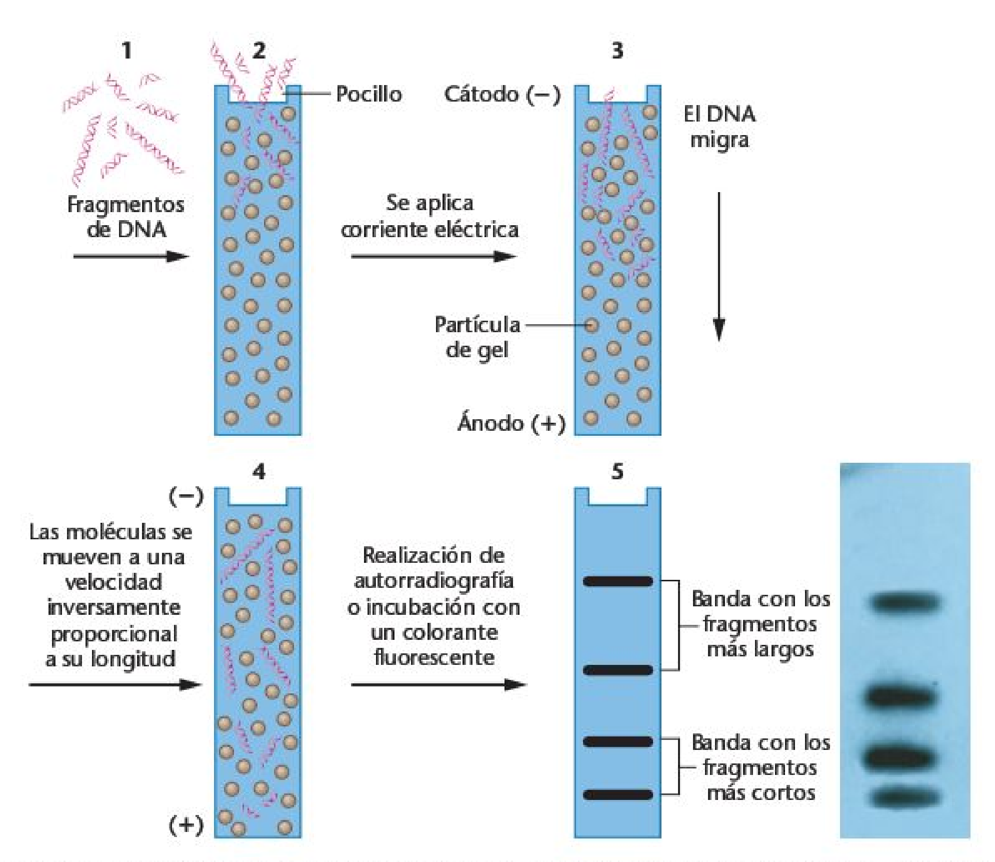


FIGURA 10.27 Separación electroforética de una mezcla de fragmentos de DNA de distinto tamaño. La fotografía muestra un gel de agarosa con las mismas bandas de DNA que el esquema.

común que se tratan posteriormente en este libro (Capítulos 19 y 22). Especialmente importantes son las diversas técnicas de *blotting* («transferencia») (p.e., *Southern blots*, *Western blots*, etc.), así como los métodos de secuenciación de DNA.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Los giros de la revolución helicoidal

La civilización occidental se ve frecuentemente transformada por nuevas ideas científicas que derriban nuestros propios conceptos y que alteran constantemente las relaciones entre personas y con el resto del mundo animado. Durante 50 años nos hemos visto envueltos en una de estas revoluciones, tan importante como la generada por la teoría de la evolución de Darwin o el rechazo de Copérnico a la idea de Ptolomeo de que la Tierra era el centro del universo.

Esta revolución empezó en abril de 1953 con el descubrimiento de Watson y Crick de la estructura molecular del DNA. El hallazgo de que la molécula de DNA consiste en una doble hélice, que se mantiene mediante puentes de hidrógeno entre pares de bases específicos, proporcionó de repente una solución elegante a las antiguas preguntas sobre los mecanismos de la herencia, la mutación y la evolución. Algunos de los grandes misterios de la vida podían explicarse mediante la sencillez y la simplicidad de una hélice que replica y baraja el código de la vida.

Después de 1953, la doble hélice se convirtió con rapidez en el foco de la ciencia moderna. Utilizando el conocimiento de la estructura helicoidal del DNA, los biólogos moleculares desarrollaron rápidamente métodos para purificar, mutar, cortar y pegar DNA en un tubo de ensayo. Cortaban DNA de un organismo y lo pegaban al de otro, y luego introducían estas moléculas quiméricas en bacterias o en células en cultivo. Leían la secuencia nucleotídica de genes y modificaban los caracteres de bacterias, hongos, moscas del vinagre y ratones eliminando y mutando sus genes, o introduciéndoles genes de otros organismos. En el 50 aniversario del modelo de doble hélice de Watson y Crick, el Proyecto Genoma Humano anunció el fin del mayor

proyecto de DNA realizado hasta la fecha, la secuenciación del genoma humano completo.

En sólo 50 años, la revolución helicoidal había afectado la vida de millones de personas. Actualmente podemos realizar diagnósticos genéticos sencillos, como para la enfermedad de Tay-Sachs, la fibrosis quística y la anemia falciforme. Utilizando tecnologías de DNA podemos fabricar grandes cantidades de proteínas con relevancia médica, como la insulina y la hormona de crecimiento. Los análisis forenses de DNA contribuyen a declarar culpables a criminales, a exonerar inocentes y a establecer paternidades. Siguiendo rastros de DNA, los antropólogos pueden rastrear el origen de los humanos en el tiempo y en el espacio.

La revolución helicoidal ha alterado profundamente nuestra visión del mundo de los seres vivos. Aunque los científicos rechazan la idea de que los humanos somos simplemente el producto de nuestros genes, la cultura popular otorga al DNA poderes casi mágicos. Se dice que los genes explican la personalidad, la elección de la profesión, la tendencia criminal, la inteligencia, e incluso las preferencias por un tipo de moda y la tendencia política. Los anuncios se apropian del lenguaje genético para otorgar a objetos inanimados una «genealogía» o una «ventaja genética». La cultura popular tiene al DNA por una fuerza inmortal, con la capacidad de afectar la moral y el destino. Se proclama que la doble hélice es la esencia de la vida, con el poder de modular nuestro destino. Tienen más resonancia las explicaciones genéticas sencillas sobre nuestro comportamiento que las explicaciones que implican influencias sociales, factores económicos o la libre voluntad. La belleza, la simetría y la importancia biológica de la doble hélice han sido insinuadas en el arte, en películas, en anuncios y en la música. Cuadros, esculturas, películas e incluso videojuegos y perfumes utilizan el lenguaje y el imaginario de la genética para conferir a la molécula de DNA todo el poder y el miedo de la tecnología moderna.

¿Y el futuro? ¿Podemos predecir cómo la doble hélice y la genética modificarán nuestro mundo durante los próximos 50 años? Aunque las profecías son arriesgadas, determinados avances científicos parecen asegurados. Con la finalización del Proyecto Genoma Humano, sin duda se identificarán cada vez más genes que controlan los procesos normales y alterados. A la vez, esto incrementará la posibilidad de diagnosticar y predecir enfermedades genéticas. En los próximos 50 años podemos esperar técnicas biotecnológicas tan complejas como la terapia génica, diagnósticos prenatales y programas de rastreo de susceptibilidad a enfermedades tan complejas como las cardíacas o el cáncer. Continuaremos ampliando las aplicaciones de la ingeniería genética en agricultura manipulando genes de animales y plantas para incrementar la productividad, la resistencia a enfermedades y el sabor.

La revolución helicoidal continuará transformando el concepto que tenemos de nosotros mismos y del resto de criaturas. A medida que se vaya comparando el genoma humano con el de otros animales se irá haciendo cada vez más evidente que estamos estrechamente relacionados con el resto de animales del mundo. La secuencia de nucleótidos del genoma humano presenta sólo un 1% de diferencia con la de los chimpancés, y algunos de nuestros genes son virtualmente idénticos a sus homólogos de plantas, de animales y de bacterias. A medida que nos demos cuenta del alcance de nuestro parentesco evolutivo, que se extiende durante miles de millones de años en una cadena lineal desde el primer ser vivo de la Tierra, posiblemente cambiará nuestra relación con los animales y con nosotros mismos. Es posible que cuando se identifiquen más genes que contribuyen a caracteres tan simples como el color de los ojos o tan complejos como la inteligencia o la orientación sexual, nos definamos a nosotros mismos más como seres genéticos y menos como criaturas con una voluntad libre o como productos del ambiente.

Durante los próximos 50 años nos enfrontaremos inevitablemente con las consecuencias prácticas y filosóficas de la revolución del DNA. ¿Utilizará la sociedad el DNA en beneficio de todos, o se utilizará este nuevo conocimiento genético como una vía de discriminación? A medida que la genética moderna nos garantice más dominio sobre la vida, ¿incrementará paradójicamente nuestro sentido de poder? La nueva concepción de nosotros mismos centrada en el DNA, ¿incrementará nuestra compasión por todas las formas de vida, o será nuestra percepción de separación del mundo natural la que se verá incrementada? Tomaremos nuestras decisiones y la historia humana continuará.

Referencias

Dennis, C., and Campbell, P. 2003. The eternal molecule. (Introduction to a series of feature articles commemorating the 50th anniversary of the discovery of DNA structure.) *Nature* 421:396.

Páginas web

A Revolution at 50. [*New York Times* article on the 50th anniversary of the discovery of DNA structure.]

http://www.nytimes.com/indexes/2003/02/25/health/genetics/index.html

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. La existencia de material genético capaz de replicación, almacenaje, expresión y mutación se deduce de los patrones de herencia observados en los organismos.
2. Tanto las proteínas como los ácidos nucleicos se consideraron, inicialmente, candidatos posibles para el material genético. Las proteínas son más diversas que los ácidos nucleicos (un requerimiento del material genético), y se vieron favorecidas debido a los avances en química de proteínas que se hicieron en esa época. Además, la hipótesis del tetranucleótido de Levene había infravalorado la magnitud de la diversidad química inherente a los ácidos nucleicos.
3. En 1952, estudios y experimentos de transformación hechos en bacterias infectadas por bacteriófagos sugirieron firmemente que el DNA es el material genético en bacterias y en la mayoría de virus.

4. Inicialmente, sólo evidencias circunstanciales apoyaban la idea de que el DNA controlaba la herencia en eucariotas. Estas incluían la distribución del DNA en la célula, análisis cuantitativos de DNA y estudios de mutagénesis inducida por UV. Las técnicas más recientes de DNA recombinante, así como experimentos con ratones transgénicos, han proporcionado pruebas experimentales directas de que el DNA es el material genético en eucariotas.
5. Numerosos virus proporcionan una excepción importante a esta regla general, ya que muchos de ellos utilizan el RNA como material genético. Estos incluyen a bacteriófagos y a virus vegetales y animales.
6. El establecimiento del DNA como material genético preparó el terreno para la expansión de la investigación en genética molecular, y ha servido de piedra angular para importantes investigaciones durante medio siglo.
7. A finales de la década de 1940 y a principios de la de 1950 se hizo un considerable esfuerzo para integrar la información acumulada sobre la estructura química de los ácidos nucleicos en un modelo de estructura molecular para el DNA. Los datos de cristalografía de rayos X de Franklin y Wilkins sugirieron que el DNA era algún tipo de hélice. En 1953, Watson y Crick pudieron construir un modelo de estructura de doble hélice del DNA basado en los estudios de difracción de rayos X y en los análisis de composición de bases de Chargaff.
8. La molécula de DNA muestra una orientación antiparalela y un emparejamiento complementario de bases adenina-timina y guanina-citosina a lo largo de las cadenas polinucleotídicas. Este modelo de DNA ofrece un sencillo mecanismo para su replicación. La estructura supuesta para la hélice parece ser función de la secuencia de nucleótidos y de su entorno químico. Existen varias formas alternativas de la estructura helicoidal del DNA. Watson y Crick describieron la configuración B, una de las varias hélices dextrógiras. Wang y Rich descubrieron el DNA-Z, levógiro, cuyo significado fisiológico y genético se está investigando actualmente.
9. La segunda categoría importante de ácidos nucleicos por su función genética es el RNA, que es similar al DNA con las excepciones de que suele ser de cadena sencilla, el azúcar ribosa reemplaza a la desoxirribosa, y la pirimidina uracilo reemplaza a la timina. Las clases de RNA -ribosómico, transferente y mensajero- facilitan el flujo de información desde el DNA al RNA y a las proteínas, que son el producto final de la mayoría de genes.
10. La estructura del DNA se presta a varios tipos de análisis, que a su vez han conducido a estudios sobre los aspectos funcionales de la maquinaria genética. La absorción de luz UV, las propiedades de sedimentación, la desnaturalización-reasociación, y los procedimientos electroforéticos están entre las herramientas importantes para el estudio de los ácidos nucleicos. El análisis de la cinética de reasociación ha permitido que los genéticos postulen la existencia de DNA repetitivo en eucariotas, en el que determinadas secuencias nucleotídicas están presentes muchas veces en el genoma.

IDEAS Y SOLUCIONES

En contraposición a capítulos anteriores, éste no pone énfasis en solucionar problemas genéticos. En lugar de ello, revisa algunos de los primeros análisis experimentales que sirvieron de piedra angular a la genética moderna. De esta manera, la sección Ideas y soluciones dirige su énfasis hacia el pensamiento racional y analítico, un enfoque que se utilizará, siempre que sea necesario, en los capítulos restantes.

1. (a) Basándose estrictamente en los datos del análisis de transformación de Avery, MacLeod y McCarthy, ¿qué objeción se podría hacer a la conclusión de que el DNA es el material genético? ¿Qué otras conclusiones se podrían considerar? (b) ¿Que observaciones rebaten esta objeción?

Solución: (a) Basándose únicamente en sus resultados, se podría concluir que el DNA es esencial para la transformación. Sin embargo, el DNA podría haber sido una sustancia que causase la formación de la cápsula convirtiendo *directamente* células no encapsuladas en células con cápsula. Es decir, el DNA podría haber desempeñado sencillamente una función catalítica en la síntesis de la cápsula, haciendo que las células exhibieran colonias lisas del tipo III.

Solución: (b) Primero, las células transformadas pasaban el carácter a sus descendientes, apoyando así la conclusión de que el DNA es responsable de la herencia, y no de la producción directa de las cubiertas de polisacáridos. Segundo, experimentos de transformación posteriores por un período de cinco años mostraron que otros caracteres, como la resistencia a antibióticos, podían transformarse. Por lo tanto, el factor transformante tiene un amplio efecto general, no uno de específico en la síntesis de polisacáridos. Esta observación está de acuerdo con la conclusión de que el DNA es el material genético.

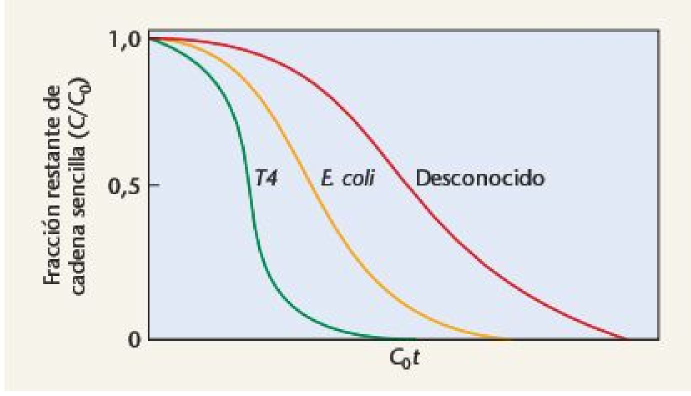
2. Si el RNA fuese el material genético universal, ¿como habría afectado a los experimentos de Avery y de Hershey-Chase?

Solución: En el experimento de Avery, la digestión del filtrado soluble con RNasa en vez de con DNasa hubiera eliminado la transformación. Si esto hubiera sucedido, Avery y sus colaboradores habrían concluido que el RNA era el factor transformante. Los resultados de Hershey-Chase no habrían cambiado ya que el ^{32}P también habría marcado el RNA, pero no la proteína. Si hubiesen utilizado un bacteriófago que tuviese RNA como ácido nucleico y ellos lo hubiesen sabido, habrían concluido que el RNA era el responsable de dirigir la reproducción de sus bacteriófagos.

3. En el DNA de erizo de mar, que es de doble cadena, el 17,5 por ciento de bases son citosinas (C). ¿Qué porcentaje de las otras tres bases contiene?

Solución: La cantidad de C≡G, por lo que también hay un 17,5 por ciento de guanina. El resto de bases, A y T, están presentes en la misma cantidad , y juntas representan el resto de bases $(100 - 35)$. Por lo tanto, $A = T = 65/2 = 32,5$ por ciento.

4. La búsqueda para aislar el organismo causante de una importante enfermedad fue un éxito y los biólogos moleculares hicieron un gran trabajo. El organismo contenía, como material genético, un ácido nucleico con la siguiente composición de bases: A = 21%, C = 29%, G = 29% y U = 21%. Cuando se calentaba, mostraba un importante efecto hipercrómico, y cuando se estudiaba su cinética, el ácido nucleico de este organismo proporcionaba la curva C_0t que se muestra a continuación comparada con la del fago T4 y la de *E. coli*. T4 contiene 10^5 pares de nucleótidos. Analice cuidadosamente esta información y proponga *todas* las conclusiones sobre el material genético de este organismo, basadas estrictamente en estas observaciones. ¿Qué información sencilla e importante, que no se cita, es necesaria para confirmar su hipótesis sobre las características de esta molécula?



Solución: Primero, debido a la presencia de uracilo (U), la molécula parece ser de RNA. En contraste con un RNA normal, la proporción de bases de éste es de A/U = G/C = 1, lo que sugiere que la molécula podría ser una doble hélice. La variación hipercrómica y la cinética de reasociación apoyan esta hipótesis. El estudio de su cinética, basado en la forma de la curva C_0t, muestra que no hay secuencias de DNA repetitivo. Más aún, la complejidad (*X*), o longitud total de DNA de secuencia única, es mayor que la del fago T4 (10^5 pares de nucleótidos) y que la de *E. coli*. *Podría* tener un mayor número de genes que T4 y que *E.coli*, pero el DNA de secuencia única de más podría tener cualquier otra función, o no tener ninguna función genética. La información que falta hace referencia a los azúcares. Nuestro modelo predice que está presente la ribosa y no la desoxirribosa. Si fuese así, este dato apoyaría la hipótesis de que el RNA es el material genético de este organismo.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Las funciones adscritas al material genético son la replicación, expresión, almacenaje y mutación. ¿Qué significa cada uno de estos términos?

2. Discuta los motivos por los que, antes de 1940, las proteínas se veían favorecidas sobre el DNA como material genético. ¿Cuál fue el papel de la hipótesis del tetranucleótido en esta controversia?

3. Contraste las diversas contribuciones que, para entender la transformación, hicieron Griffith, Avery y sus colaboradores, y Taylor.

4. Cuando Avery y sus colaboradores obtuvieron lo que se concluyó que era DNA purificado de células III*S* virulentas, lo trataron con proteasas, RNasa y DNasa, y realizaron un análisis de conservación o pérdida de capacidad transformante. ¿Cuáles fueron los objetivos y resultados de estos experimentos? ¿Qué conclusiones extrajeron?

5. ¿Por qué se eligió ^{32}P y ^{35}S en el experimento de Hershey-Chase? Discuta la lógica y las conclusiones de este experimento.

6. El diseño del experimento de Hershey-Chase, ¿distingue entre el DNA y el RNA como la molécula que sirve de material genético? ¿Por qué sí o por qué no?

7. ¿Podría funcionar un experimento similar al realizado por Hershey y Chase si se aplicase el diseño básico al fenómeno de transformación? Explique el por qué.

8. ¿Qué observaciones son congruentes con la conclusión de que el DNA sirve de material genético en los eucariotas? Enumérelas y discútalas.

9. ¿Cuales son las excepciones a la norma general de que el DNA es el material genético de todos los organismos? ¿Qué evidencias apoyan estas excepciones?

10. Dibuje la estructura química de los tres componentes de un nucleótido y únalos entre ellos. ¿Qué átomos son eliminados de las estructuras al formarse las uniones?

11. ¿Cómo se enumeran los átomos de carbono y de nitrógeno de los azúcares, de las purinas y de las pirimidinas?

12. La adenina también se puede nombrar 6-amino purina. ¿Cómo nombraría a las otras cuatro bases nitrogenadas usando este sistema alternativo? (O es oxi y CH_3 es metil)

13. Dibuje la estructura química de un dinucleótido formado por A y G. Opuesto a esta estructura, dibuje el dinucleótido TC en dirección antiparalela (o invertida). Dibuje los posibles puentes de hidrógeno.

14. Describa las distintas características del modelo de doble hélice de DNA de Watson-Crick.

15. ¿De qué evidencias disponían Watson y Crick en 1953? ¿Cuál fue su enfoque para llegar a la estructura del DNA?

16. Si los datos de Chargaff obtenidos de una sola fuente fuesen los de la siguiente tabla, ¿qué conclusión podrían haber sacado Watson y Crick?

	A	T	G	C
%	29	19	21	31

¿Por qué esta conclusión sería contradictoria con los datos de Wilkins y Franklin?

17. ¿En qué se diferencian los enlaces covalentes de los puentes de hidrógeno? Defina el concepto de complementariedad de bases.

18. Enumere las tres diferencias más importantes entre el DNA y el RNA.

19. ¿Cuáles son los tres tipos de moléculas de RNA? ¿Cómo se relaciona cada uno de ellos con el concepto de flujo de información?

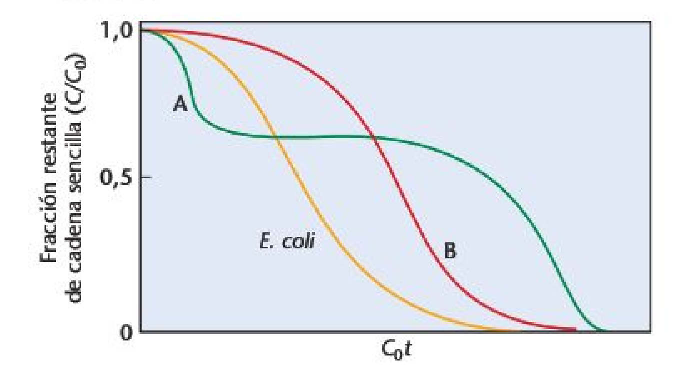
20. ¿Qué componente de los nucleótidos es el responsable de la absorción de luz ultravioleta? ¿Por qué es importante esta técnica para el análisis de los ácidos nucleicos?

21. Distinga entre centrifugación por velocidad de sedimentación y por equilibrio de sedimentación (centrifugación en gradiente de densidad).

22. ¿Cuál es el fundamento para determinar la composición de bases mediante la centrifugación por gradiente de densidad?

23. ¿Cuál es el estado físico del DNA después de la desnaturalización?

24. Compare las siguientes curvas que representan cinéticas de reasociación.



¿Qué se puede decir sobre el DNA representado por cada curva respecto al de *E. coli*?

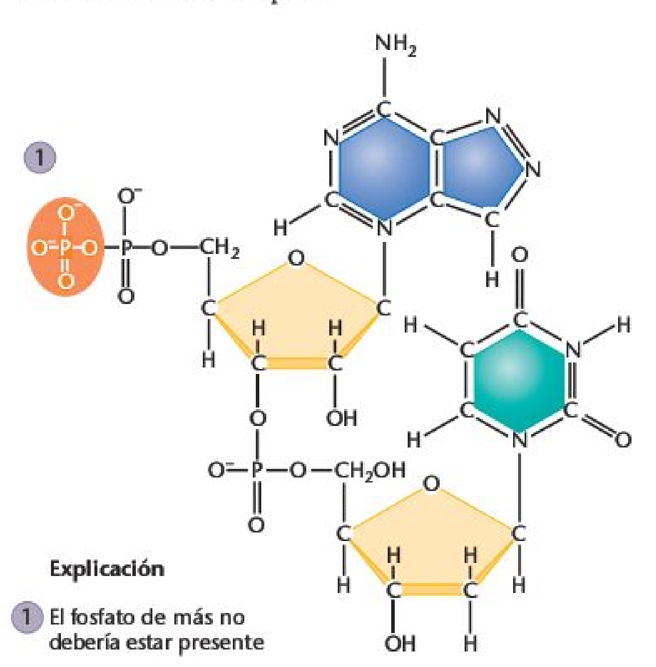
25. ¿Qué es el efecto hipercrómico? ¿Cómo se mide? ¿Qué implica la T_m?

26. ¿Por qué la T_m está relacionada con la composición de bases?

27. ¿Cuál es la base química de la hibridación molecular?

28. ¿Qué sugiere el modelo de Watson-Crick sobre la replicación del DNA?

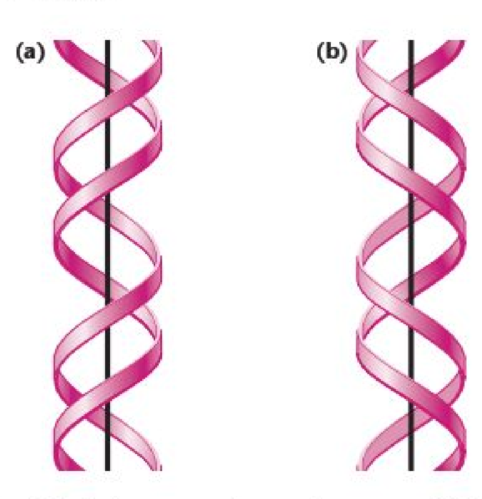
29. Se pidió a un estudiante de genética que dibujase la estructura química de un dinucleótido de DNA de adenina y timina. A continuación se muestra su respuesta.



El estudiante cometió seis errores importantes. Uno de ellos, con el número 1, está marcado y explicado. Halle los otros cinco. Márquelos numerándolos del 2 al 6, y explíquelos brevemente según el ejemplo dado.

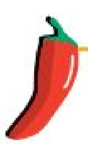
30. El DNA del virus bacteriano T4 produce un valor $C_0t_{1/2}$ de 0,5 y su genoma contiene 10^5 pares de nucleótidos. ¿Cuántos pares de nucleótidos contiene el genoma del virus MS2 y el de la bacteria *E. coli*, cuyos DNA producen un valor $C_0t_{1/2}$ de 0,001 y 10,0 respectivamente?

31. Teniendo en cuenta la información de este capítulo sobre DNA-B y DNA-Z, y sobre hélices dextrógiras y levógiras, analice cuidadosamente las siguientes estructuras y extraiga conclusiones sobre la naturaleza helicoidal de (a) y (b). ¿Cuál es dextrógira y cuál levógira?



32. Una de las lesiones espontáneas más comunes del DNA en condiciones fisiológicas es la hidrólisis del grupo amino de las citosinas, convirtiéndolas en uracilos. ¿Cuál será el efecto sobre la estructura del DNA si un grupo uracilo reemplaza una citosina?

33. En algunos organismos, el carbono 5 del anillo de la pirimidina de la citosina se metila después de incorporarse al DNA. Si se hidroliza una 5-metil citosina como se describe en el Problema 32, ¿qué base se generará?



Problemas extra-picantes

34. Se descubrió un eucariota primitivo que mostraba un ácido nucleico extraño como material genético. Su análisis reveló las siguientes observaciones.

(i) Estudios de difracción de rayos X muestran un patrón similar al del DNA, pero con algunas dimensiones diferentes y más irregular.
(ii) Se observa una importante variación hipercrómica tras calentar y detectar la absorción de UV a 260 nm.
(iii) El análisis de composición de bases muestra cuatro bases en las siguientes proporciones.

Adenina	=	8%
Guanina	=	37%
Xantina	=	37%
Hipoxantina	=	18%

(iv) Aproximadamente el 75 por ciento de los azúcares son desoxirribosas, mientras que el 25 por ciento son ribosas.

Trate de resolver la estructura de esta molécula postulando un modelo que sea coherente con las anteriores observaciones.

35. *Fecha: 1 de marzo del 2015.* Se ha descubierto una criatura extraña durante la exploración espacial. Hace poco se ha aislado y analizado su material genético. Este material es similar al DNA en algunos aspectos de su composición química. Contiene el azúcar de 4 carbonos eritrosa en abundancia, y un equivalente molar de grupos fosfato. Además, contiene seis bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), hipoxantina (H) y xantina (X). Estas bases están presentes en las siguientes proporciones relativas:

$$A = T = H \quad y \quad C = G = X$$

Estudios de difracción de rayos X han establecido que la molécula es regular y tiene un diámetro constante de unos 30 Å.

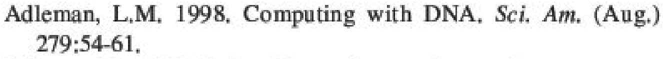
En conjunto, estos datos han sugerido un modelo para la estructura de esta molécula.

(a) Proponga un modelo general de esta molécula. Descríbalo brevemente.
(b) ¿Qué propiedades de emparejamiento de bases debe existir para H y X en este modelo?
(c) Dado el diámetro constante de 30 Å, ¿cree que H y X son (i) las dos purinas o las dos pirimidinas, o (ii) una es una purina y la otra es una pirimidina?

36. Se le suministran muestras de DNA de dos virus bacterianos recientemente descubiertos. Basándose en las distintas técnicas analíticas tratadas en este capítulo, diseñe un protocolo de investigación que permita caracterizar y comparar el DNA de ambos virus. Indique qué tipo de información espera obtener de cada una de las técnicas que incluya en el protocolo.

37. Durante la electroforesis en gel, las moléculas de DNA pueden separarse fácilmente según su tamaño puesto que todas ellas tienen la misma proporción carga:masa y la misma forma (como una cuerda larga). ¿Espera que las moléculas de RNA se comporten de la misma manera que las de DNA durante una electroforesis en gel? ¿Por qué sí o por qué no?

LECTURAS SELECCIONADAS



Adleman, L.M. 1998. Computing with DNA. *Sci. Am.* (Aug.) 279:54-61.

Alloway, J.L. 1933. Further observations on the use of pneumococcus extracts in effecting transformation of type *in vitro*. *J. Exp. Med.* 57:265-78.

Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79:137-58. (Reprinted in Taylor, J.H. 1965. *Selected papers in molecular genetics*. Orlando, FL: Academic Press.)

Britten, R.J., and Kohne, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-40.

Chargaff, E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism for their enzymatic degradation. *Experientia* 6:201-9.

Dawson, M.H. 1930. The transformation of pneumococcal types: I. The interconvertibility of type-specific *S. pneumococci*. *J. Exp. Med.* 51:123-47.

Dickerson, R.E., et al. 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216:475-85.

Dubos, R.J. 1976. *The professor, the Institute and DNA: Oswald T. Avery, his life and scientific achievements*. New York: Rockefeller University Press.

Felsenfeld, G. 1985. DNA. *Sci. Am.* (Oct.) 253:58-78.

Fraenkel-Conrat, H., and Singer, B. 1957. Virus reconstruction: II. Combination of protein and nucleic acid from different strains. *Biochim. Biophys. Acta* 24:530-48. (Reprinted in Taylor, J.H. 1965. *Selected papers in molecular genetics*, Orlando, FL: Academic Press.)

Franklin, R.E., and Gosling, R.G. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171:740-41.

Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27:113-59.

Guthrie, G.D., and Sinsheimer, R.L. 1960. Infection of protoplasts of *Escherichia coli* by subviral particles. *J. Mol. Biol.* 2:297-305.

Hershey, A.D., and Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Phys.* 36:39-56. (Reprinted in Taylor, J.H. 1965. *Selected papers in molecular genetics.* Orlando, FL: Academic Press.)

Levene, P.A., and Simms, H.S. 1926. Nucleic acid structure as determined by electrometric titration data. *J. Biol. Chem.* 70:327-41.

McCarty, M.. 1985. *The transforming principle: Discovering that genes are made of DNA.* New York: W. W. Norton.

Olby, R. 1974. *The path to the double helix.* Seattle: University of Washington Press.

Pauling, L., and Corey, R.B. 1953. A proposed structure for the nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 39:84-97.

Rich, A., Nordheim, A., and Wang, A.H.-J. 1984. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 53:791-846.

Spizizen, J. 1957. Infection of protoplasts by disrupted T2 viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43:694-701.

Stent, G.S., ed. 1981. *The double helix: Text, commentary, review, and original papers.* New York: W. W. Norton.

Varmus, H. 1988. Retroviruses. *Science* 240:1427-35.

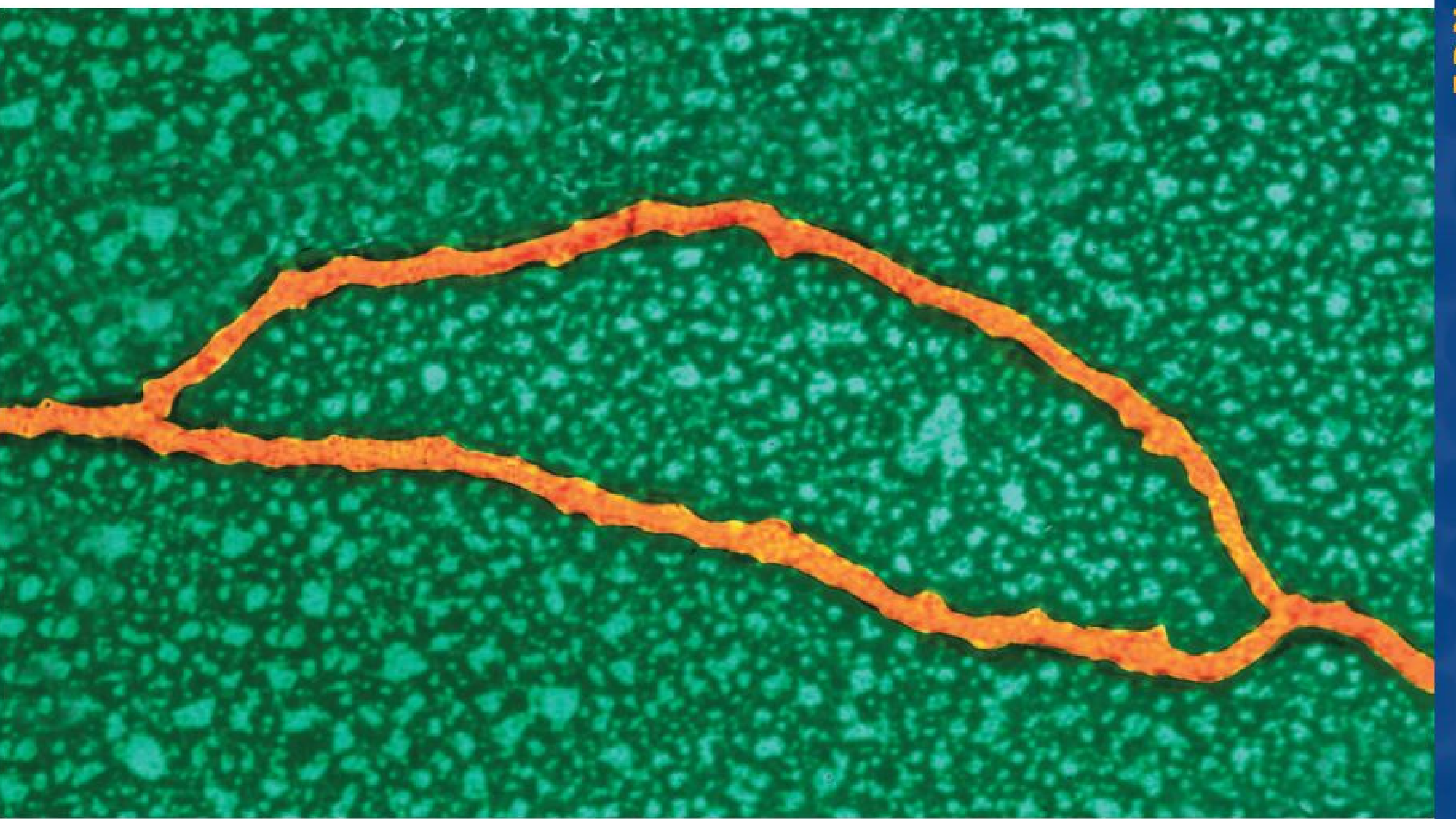
Watson, J.D. 1968. *The double helix.* New York: Atheneum.

Watson, J.D., and Crick, F.C. 1953a. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171:737-38.

———1953b. Genetic implications of the structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:964.

Wilkins, M.H.F., Stokes, A.R., and Wilson, H.R. 1953. Molecular structure of desoxypentose nucleic acids. *Nature* 171:738-40.

Replicación y recombinación del DNA



Micrografía electrónica de transmisión de DNA humano de una célula HeLa, que muestra una horquilla de replicación característica de la replicación activa del DNA.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La continuidad genética entre las células progenitoras y sus descendientes se mantiene mediante la replicación semiconservativa del DNA, como predice el modelo de Watson-Crick.
- En la replicación semiconservativa cada cadena de la doble hélice progenitora sirve de molde para la producción de su complementaria, y cada doble hélice resultante incluye una cadena de DNA «vieja» y una de «nueva».
- La síntesis de DNA es un proceso complejo y ordenado, y se produce bajo la dirección de una miríada de enzimas y de otras proteínas.
- La síntesis de DNA conlleva la polimerización de nucleótidos en cadenas polinucleotídicas.
- La síntesis de DNA es parecida en procariotas y en eucariotas, aunque es más compleja en estos últimos.
- La recombinación genética, un proceso importante que conduce al intercambio de segmentos entre moléculas de DNA, se produce bajo la dirección de un grupo de enzimas.

Seminario Web 11.1
Replicación del DNA

Tras la propuesta de Watson y Crick de la estructura del DNA, los científicos centraron su atención en cómo se replica esta molécula. Este proceso es una función esencial del material genético y debe ser ejecutado con precisión si, tras la división celular, se ha de mantener la continuidad genética entre células. Es una tarea enorme y compleja. Consideremos por un momento que hay del orden de 3×10^9 pares de bases (tres mil millones) en los 23 cromosomas del genoma humano. Duplicar fielmente el DNA de uno solo de estos cromosomas requiere un mecanismo de extremada precisión. Incluso una tasa de error de tan solo 10^{-6} (uno en un millón), crearía 3.000 errores en cada ciclo de replicación del genoma (lo que obviamente es un número excesivo). Aunque no está exento de error, y la mayor parte de la evolución no se habría producido si lo estuviese, un sistema de replicación del DNA mucho más preciso ha evolucionado en todos los organismos.

Como Watson y Crick sugirieron en el párrafo final de su artículo de 1953 (que se reproduce en la página 250), el modelo de la doble hélice que propusieron proporcionó la pista inicial de cómo puede producirse la replicación. Este modo de replicación, denominado *replicación semiconservativa*, pronto recibió confirmaciones experimentales de numerosos estudios en virus, procariotas y eucariotas. Una vez se clarificó el modelo general de la replicación, se intensificó la investigación para determinar los detalles precisos de la síntesis de DNA. Lo que se ha descubierto desde entonces es que se necesitan numerosas enzimas y otras proteínas para copiar una hélice de DNA. Debido a la complejidad de los fenómenos químicos que acaecen durante la síntesis, este tema es todavía un área de investigación extremadamente activa.

En este capítulo trataremos el modelo general de replicación así como los detalles específicos de la síntesis de DNA. La investigación que conduce a estos conocimientos es otro eslabón en nuestra comprensión de los procesos de la vida en el ámbito molecular.

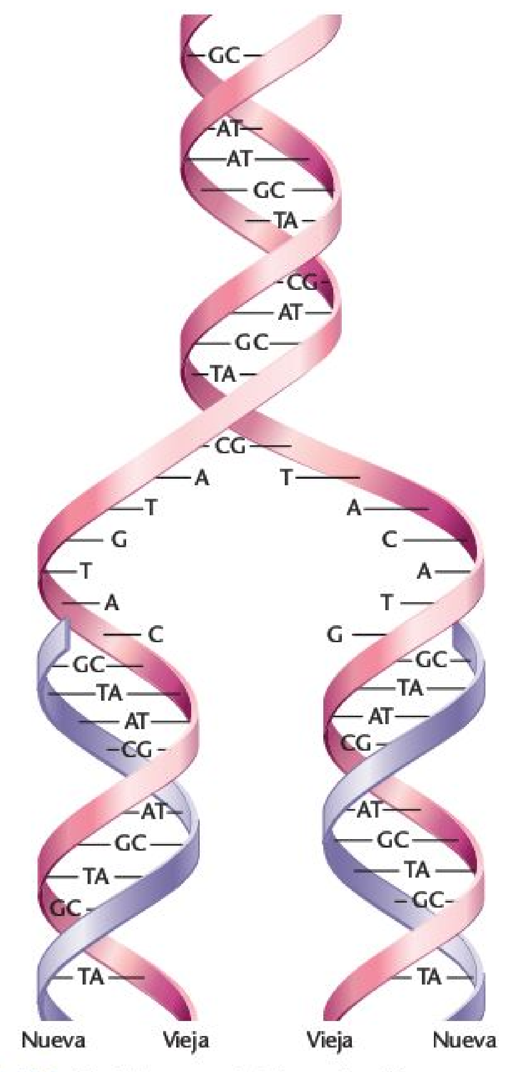


FIGURA 11.1 Modelo general de la replicación semiconservativa del DNA. La síntesis nueva se muestra en color lila.

11.1 El DNA se reproduce por replicación semiconservativa

Para Watson y Crick, estaba claro que, debido a la ordenación y naturaleza de las bases nitrogenadas, cada cadena de DNA de la doble hélice podía servir de molde para la síntesis de su complementaria (Figura 11.1). Propusieron que si la hélice se desenrollase, cada nucleótido a lo largo de las dos cadenas parentales tendría afinidad por su nucleótido complementario. Como aprendimos en el Capítulo 10, la complementariedad se debe a los puentes de hidrógeno que pueden formarse. Si el ácido timidílico (T) estuviese presente, «atraería» al ácido adenílico (A); si el ácido guanidílico (G) estuviese presente, atraería al ácido citidílico (C); del mismo modo, A atraería a T, y C a G. Si a lo largo de ambos moldes estos nucleótidos se uniesen covalentemente en cadenas polinucleotídicas, el resultado sería la producción de dos dobles cadenas de DNA idénticas. Cada molécula de DNA replicada consistiría en una cadena «vieja» y una cadena «nueva»; he ahí la razón para el nombre de **replicación semiconservativa**.

Hay otras dos posibles formas de replicación que también se basan en las cadenas parentales como moldes (Figura 11.2). En la **replicación conservativa**, la síntesis de las cadenas polinucleotídicas complementarias se produciría como se ha descrito anteriormente. Después de la síntesis, sin embargo, las dos cadenas recién creadas se juntarían, y las cadenas parentales se reasociarían. Así se «conservaría» la hélice original.

En la segunda forma alternativa, denominada **replicación dispersiva**, las cadenas parentales se dispersarían entre las dos nuevas dobles hélices después de la replicación. De este modo, cada cadena estaría formada por DNA viejo y nuevo. Este modelo implicaría el corte de las cadenas parentales durante la replicación. Es la más compleja de las tres posibilidades y, por lo tanto, la menos probable. Sin embargo, no puede descartarse

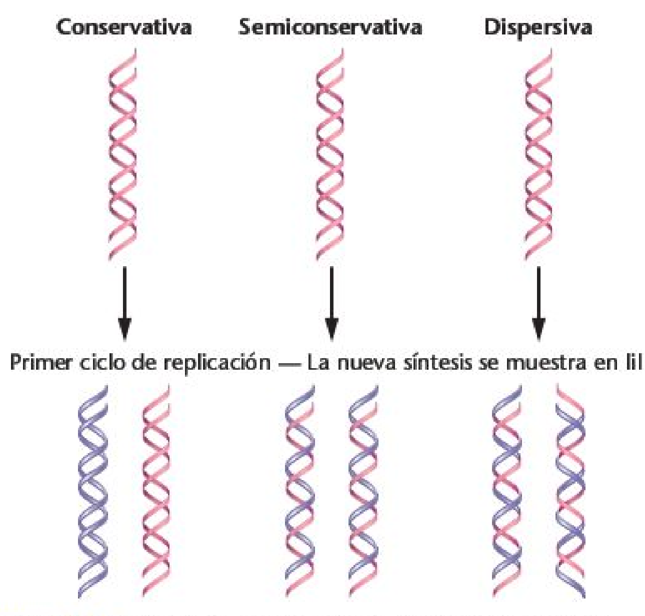


FIGURA 11.2 Resultados de un ciclo de replicación de DNA para cada uno de los tres posibles tipos de replicación.

como modelo experimental. En la Figura 11.2 se comparan los resultados teóricos de una generación de replicación para los tres diferentes modelos.

El experimento de Meselson-Stahl

En 1958, Matthew Meselson y Franklin Stahl publicaron los resultados de un experimento que proporcionaba pruebas sólidas de que la replicación semiconservativa es la forma que utilizan las células bacterianas para producir nuevas moléculas de DNA. Hicieron crecer células de *E. coli* durante muchas generaciones en un medio en el que el $^{15}NH_4Cl$ (cloruro de amonio) era la única fuente de nitrógeno. ^{15}N es un isótopo «pesado» del nitrógeno que tiene un neutrón más que el isótopo natural ^{14}N; por ello, las moléculas que contienen ^{15}N son más densas que las que contienen ^{14}N. A diferencia de los isótopos radioactivos, el ^{15}N es estable. Después de muchas generaciones, todas las moléculas que contienen nitrógeno en la células de *E. coli*, incluidas las bases nitrogenadas del DNA, contenían el isótopo pesado.

El punto clave para el éxito de este experimento es que el DNA que contiene ^{15}N puede distinguirse del que contiene ^{14}N. El procedimiento experimental precisa el uso de una técnica denominada **centrifugación por equilibrio de sedimentación**, también llamada centrifugación en gradiente de densidad (tratada en el Capítulo 10). En ella se obliga a las muestras mediante centrifugación a emigrar por un gradiente de densidad de una sal de un metal pesado, como el cloruro de cesio. Las moléculas de DNA alcanzarán el equilibrio cuando su densidad sea igual a la del gradiente del medio. El DNA-^{15}N alcanzará este punto en una posición más cercana a la base del tubo que el DNA-^{14}N.

En este experimento (Figura 11.3) se transfirieron células marcadas uniformemente con ^{15}N a un medio que sólo contenía $^{14}NH_4Cl$. De este modo, toda síntesis «nueva» de DNA acaecida durante la replicación contenía solo el isótopo «ligero» del nitrógeno. El momento de la transferencia se tomó como tiempo 0 ($t = 0$). Se permitió que las células de *E. coli* se replicasen durante varias generaciones, obteniéndose muestras tras dada ciclo de replicación. Se aisló el DNA de cada muestra y se centrifugó por equilibrio de sedimentación.

Después de una generación, el DNA aislado se presentaba en una única banda de densidad intermedia —el resultado esperado para la replicación semiconservativa, en la que cada mo-

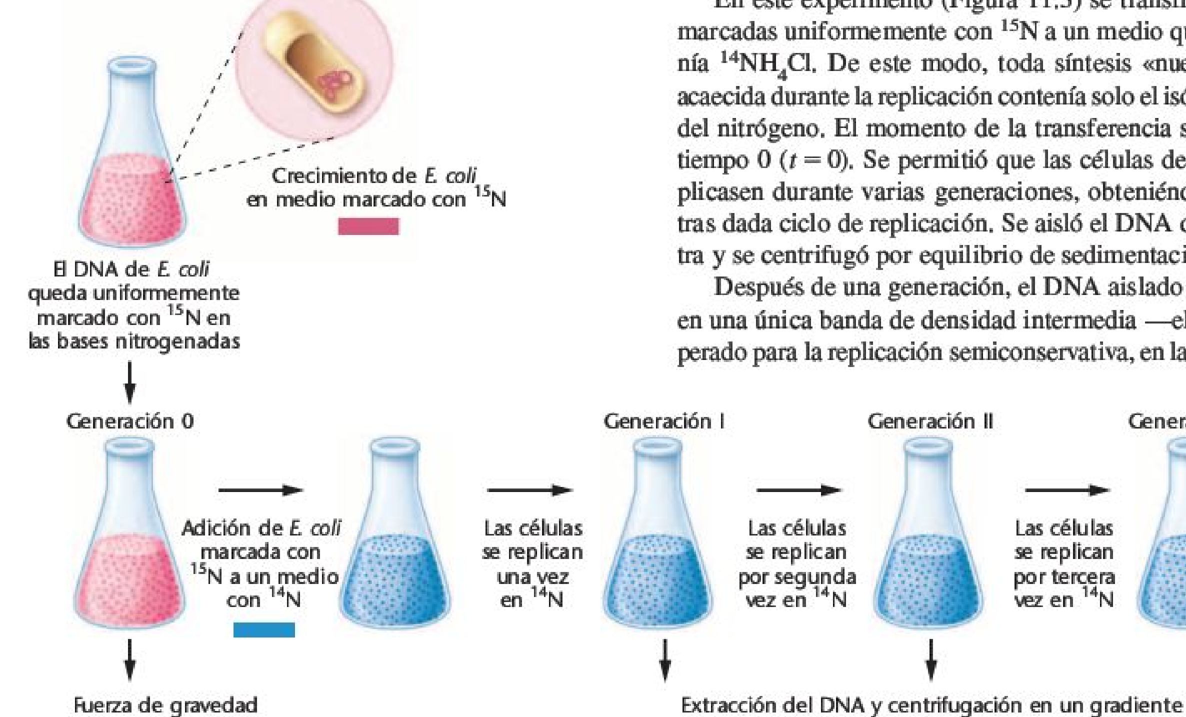


FIGURA 11.3 Experimento de Meselson-Stahl.

lécula replicada estaba compuesta de una cadena nueva con ^{14}N y una cadena vieja con ^{15}N (Figura 11.4). Este resultado no es congruente con el modelo de replicación conservativa, en el que deberían visualizarse dos bandas distintas, por lo que puede rechazarse este modelo.

Después de dos divisiones celulares, las muestras de DNA mostraron dos bandas de distinta densidad —una era intermedia y la otra era ligera, correspondiendo a la posición del ^{14}N en el gradiente. Resultados parecidos se obtuvieron después de una tercera generación, excepto que incrementó la proporción de esta última banda. De nuevo, esto era congruente con la interpretación de que la replicación es semiconservativa.

Seguramente ya se ha dado cuenta de que una molécula con densidad intermedia también es congruente con la replicación dispersiva. Sin embargo, Meselson y Stahl descartaron este modelo de replicación según dos observaciones. En primer lugar, tras la primera generación de replicación en el medio que contenía ^{14}N, aislaron esta molécula híbrida y la desnaturalizaron por calor. Recuerde del Capítulo 10 el calor separará el dúplex en cadenas sencillas. Cuando se determinó la densidad de las cadenas sencillas del híbrido, éstas mostraron un perfil de ^{15}N *o* de ^{14}N, pero *no* una densidad intermedia. Esta observación es congruente con el modelo semiconservativo y es además incongruente con el modelo dispersivo.

Además, si la replicación fuese dispersiva, *todas* las generaciones después de $t = 0$ mostrarían DNA de densidad intermedia. Después de la primera generación, y en cada una de las siguientes generaciones, la proporción de $^{15}N/^{14}N$ decrecería, y la banda híbrida sería cada vez más ligera, acercándose con el tiempo a la banda de ^{14}N. No se observó este resultado. El experimento de Meselson-Stahl proporcionó en bacterias un resultado muy concluyente de la replicación semiconservativa, y contribuyó a descartar los modelos conservativo y dispersivo.

Replicación semiconservativa en eucariotas

En 1957, un año antes de que se publicase el trabajo de Meselson y sus colaboradores, J. Herbert Taylor, Philip Woods y Walter Huges presentaron pruebas de que la replicación semiconservativa también se daba en organismos eucariotas. Estos autores experimentaron con puntas de raíz de haba (*Vicia faba*), que son una fuente excelente de células en división. Las puntas de raíz son una fuente excelente de células en división. Estos investigadores pudieron seguir el proceso de replicación marcando el DNA con timidina-^{3}H, un precursor radioactivo del DNA, y realizando autorradiografía.

La **autorradiografía** es una técnica habitual que, cuando se aplica en preparaciones citológicas, determina la localización del radioisótopo en la célula. En este procedimiento, se pone emulsión fotográfica sobre una preparación histológica de material celular (meristemos radiculares en este experimento), y se guarda la preparación en un sitio oscuro. Se revela el portaobjetos de manera semejante a como se procesa una película fotográfica. Tras el revelado, y puesto que el radioisótopo emite energía, la emulsión se vuelve negra en el punto aproximado de emisión. El resultado final es la presencia de manchas oscuras o «granos» en la superficie de la sección, identificando así al DNA recién sintetizado dentro de la célula.

Taylor y sus colaboradores hicieron crecer meristemos radiculares en presencia del radioisótopo durante aproximadamente una generación, y seguidamente se transfirieron a un medio sin marcar, donde la división celular continuó. Al final de cada generación, los cultivos se detuvieron en metafase añadiendo colchicina (un derivado químico del azafrán que «envenena» la fibras del huso nuclear), y los cromosomas se examinaron por autorradiografía. Estos autores encontraron timidina radioactiva asociada sólo a las cromátidas que contenían DNA recién sintetizado. La Figura 11.5 muestra la replicación de un único cromosoma en dos ciclos de división así como la distribución de granos.

Estos resultados son compatibles con el modelo de replicación semiconservativa. Tras el primer ciclo de replicación en presencia del isótopo, se detecta radioactividad en las dos cromátidas hermanas, lo que indica que cada cromátida contiene una cadena nueva de DNA radioactiva y una cadena vieja no marcada. Después del segundo ciclo de replicación, *que también se realiza en un medio no marcado*, únicamente una de las dos nuevas cromátidas hermanas debería ser radioactiva ya que la mitad de las cadenas parentales no están marcadas. Éste es el resultado que se observa, con unas pocas excepciones debidas al intercambio entre cromátidas hermanas (que se trató en el Capítulo 6).

Conjuntamente, los experimentos de Meselson-Stahl y de Taylor, Woods y Hughes condujeron a la aceptación general del

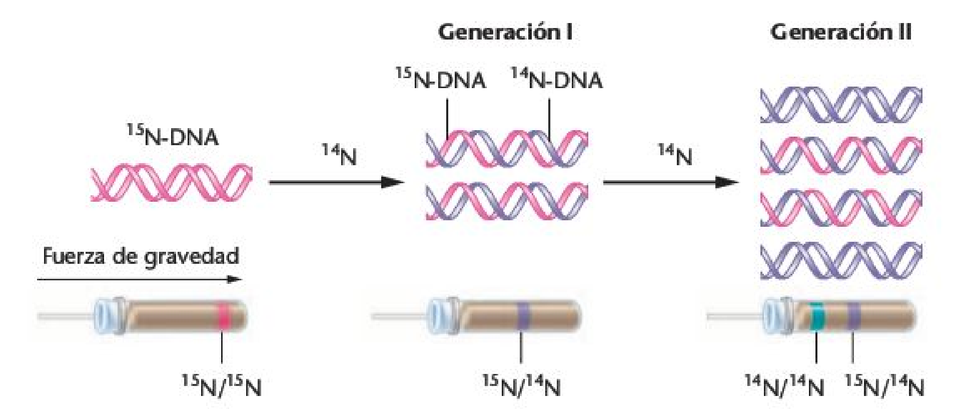


FIGURA 11.4 Resultados esperados en dos generaciones de replicación semiconservativa en el experimento de Meselson-Stahl.

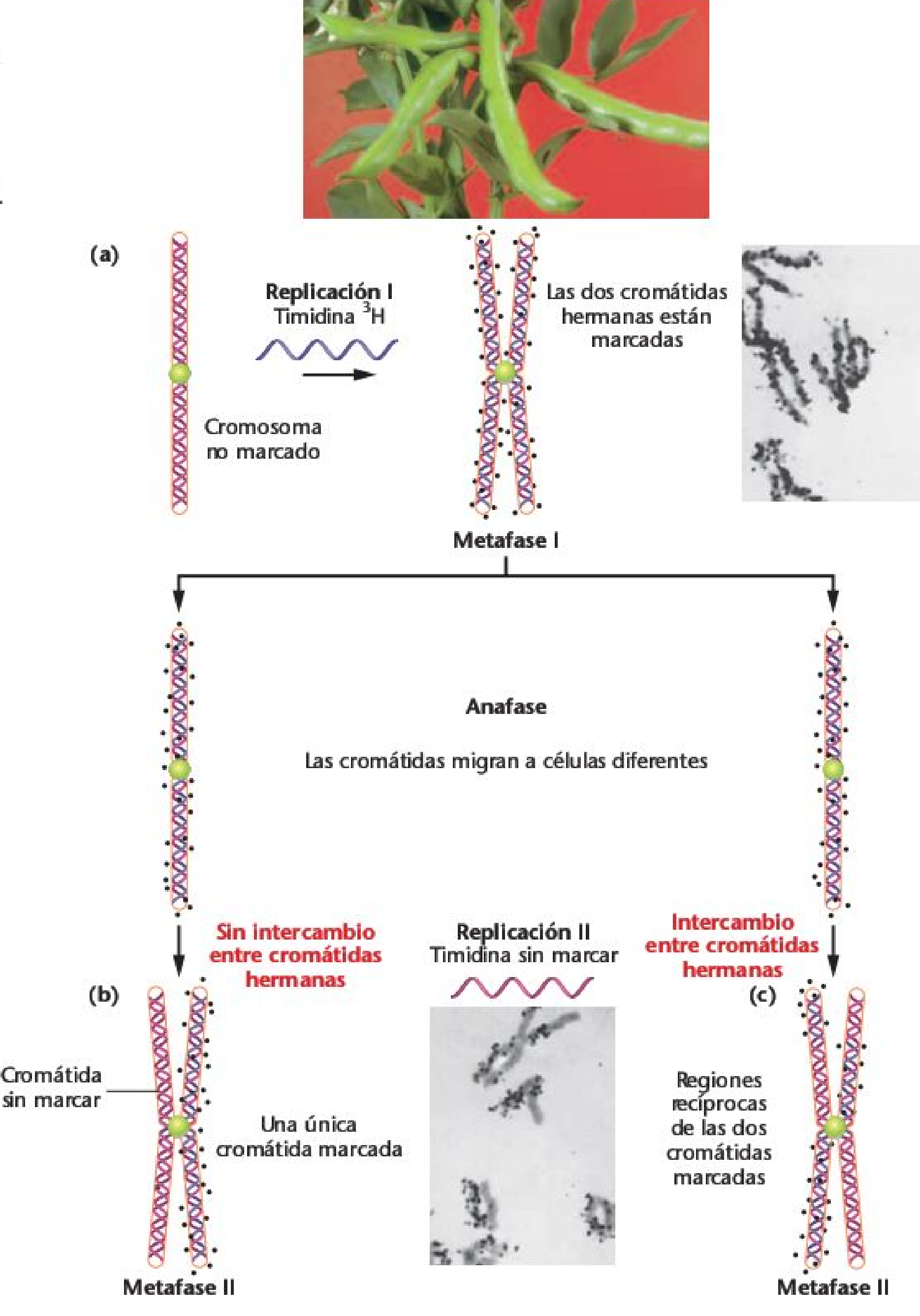


FIGURA 11.5 Experimento de Taylor, Woods y Hughes, que demuestra el modelo de replicación semiconservativo del DNA en meristemos radiculares de *Vicia faba*. En la fotografía superior se muestra un fragmento de la planta. (a) Una cromátida no marcada realiza el ciclo celular en presencia de timidina-^{3}H. Al entrar en mitosis, ambas cromátidas hermanas del cromosoma están marcadas, como muestra la autorradiografía. Después de una segunda generación de replicación (b), esta vez en ausencia de timidina-^{3}H, se espera que sólo una cromátida de cada cromosoma esté rodeada de granos. Excepto donde se han producido intercambios recíprocos entre cromátidas hermanas (c), se cumple lo previsto. Las micrografías pertenecen a los autorradiogramas originales obtenidos en el experimento.

modelo de replicación semiconservativa. Estudios posteriores realizados con otros organismos han llegado a la misma conclusión, y también han apoyado con claridad la propuesta de Watson y Crick del modelo de doble hélice del DNA.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la base experimental que permite concluir que el DNA se replica semiconservativamente tanto en procariotas como en eucariotas?

Orígenes, horquillas y unidades de replicación

Para entender mejor la replicación semiconservativa vamos a considerar brevemente algunas cuestiones importantes. La primera hace referencia al **origen de replicación**. ¿En qué lugar del cromosoma se inicia la replicación? ¿Hay un solo origen, o hay más de un punto en el que empieza la síntesis del DNA? Sea cual sea el punto de origen, ¿es éste aleatorio o está localizado en una región específica del cromosoma?

Segundo, una vez empieza la replicación, ¿continúa desde el origen en una sola dirección o en ambas? Dicho de otra manera, la **replicación** es **unidireccional** o **bidireccional**?

Para abordar estas preguntas, necesitamos introducir dos conceptos. En primer lugar, en cualquier lugar del cromosoma en que se esté produciendo replicación las cadenas de la hélice están desenrolladas, formando lo que se denomina **horquilla de replicación**. Esta horquilla aparecerá inicialmente en el punto de origen de la síntesis, y a medida que avance la replicación se moverá a lo largo del DNA dúplex. Si la replicación es bidireccional, habrá dos horquillas migrando en direcciones opuestas a partir del origen.

El segundo concepto hace referencia a la longitud del fragmento de DNA que se replica en cada suceso de replicación dado en un sólo origen. Este fragmento de DNA se considera como una unidad denominada **replicón**. En *E. coli* el replicón está formado por todo el genoma completo, de 4,2 Mb (4,2 millones de pares de bases).

Las pruebas concernientes al origen y a la dirección de la replicación son claras. John Cairns trazó la replicación en *E. coli* utilizando precursores radioactivos para la síntesis de DNA y autorradiografía. Demostró que en *E. coli* hay una única región donde se inicia la replicación, denominada *oriC*. Puesto que en bacterias y en la mayoría de bacteriófagos la síntesis de DNA se inicia en un solo punto, todo su cromosoma constituye un replicón. La presencia de un único origen es característico de las bacterias, cuyo único cromosoma es circular.

Otros resultados, también basados en autoradiografía, demostraron que la replicación es bidireccional, alejándose de *oriC* en ambas direcciones (Figura 11.6). Esto forma dos horquillas de replicación que emigran alejándose al proseguir la replicación. Cuando se completa la replicación semiconservativa de todo el cromosoma estas horquillas convergen en una región terminadora denominada *ter*. Posteriormente en este mismo capítulo veremos que en los eucariotas cada cromosoma contiene múltiples puntos de origen.

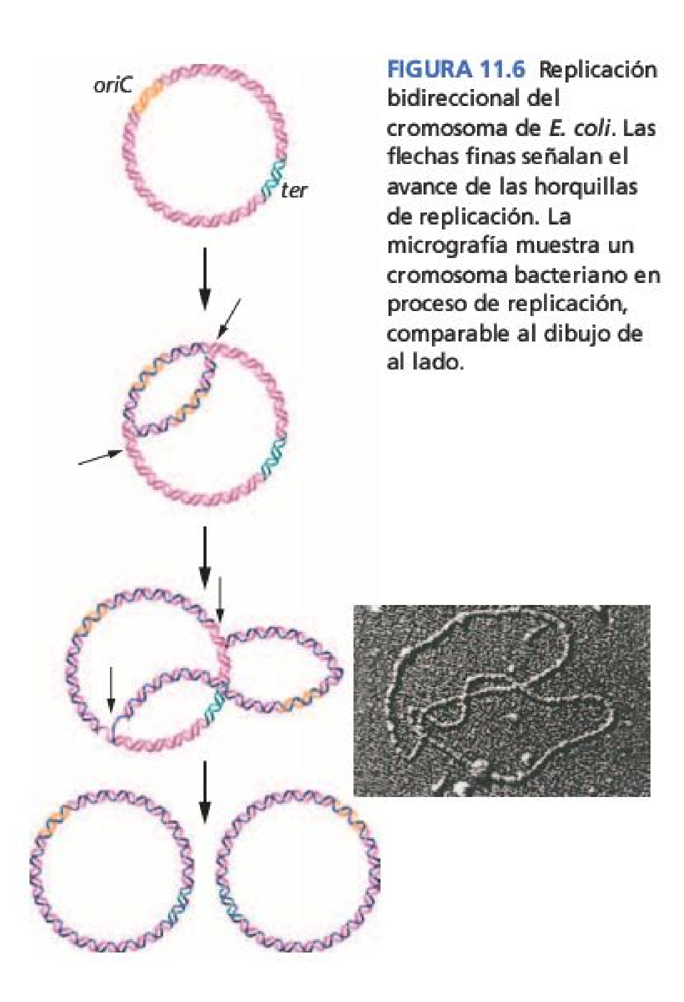


FIGURA 11.6 Replicación bidireccional del cromosoma de *E. coli*. Las flechas finas señalan el avance de las horquillas de replicación. La micrografía muestra un cromosoma bacteriano en proceso de replicación, comparable al dibujo de al lado.

11.2 En la síntesis de DNA en bacterias participan cinco polimerasas y otras enzimas

La determinación de que la replicación es semiconservativa y bidireccional indica únicamente el *patrón* de duplicación del DNA y la asociación entre las cadenas terminadas una vez se ha completado la síntesis. Una cuestión mucho más compleja es cómo se produce la *síntesis* real de una larga cadena polinucleotídica complementaria sobre un molde de DNA. Como en la mayoría de estudios de biología molecular, esta pregunta se abordó inicialmente usando microorganismos. La investigación empezó al mismo tiempo que el trabajo de Meselson-Stahl, y todavía hoy es un área activa de investigación. Lo que es más evidente de esta investigación es la enorme complejidad de la síntesis biológica del DNA.

La DNA polimerasa I

La primera publicación sobre la enzimología de la replicación del DNA la hicieron Arthur Kornberg y sus colaboradores en 1957. Estos investigadores aislaron una enzima de *E. coli* que podía dirigir la síntesis del DNA en un sistema exento células (*in vitro*). Actualmente, esta enzima recibe el nombre de **DNA polimerasa I**, ya que fue la primera en aislarse.

Kornberg determinó que para que la DNA polimerasa I dirija la síntesis de DNA *in vitro* precisa dos componentes importantes: (1) todos los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP), y (2) DNA molde.

Si se omite de la reacción cualquiera de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato no se detecta síntesis. Si se usan derivados de estas moléculas precursoras diferentes de los nucleósidos trifosfato (nucleótidos o nucleósidos difosfato), no se produce síntesis. Si no se añade DNA molde, la síntesis de DNA se ve enormemente reducida.

La mayoría de la síntesis dirigida por la enzima de Kornberg parecía ser exactamente como la requerida para la replicación semiconservativa. La reacción se resume en la Figura 11.7, en la que se representa la adición de un nucleótido. Se ha demostrado que la enzima consiste en una única cadena polipeptídica de 928 aminoácidos.

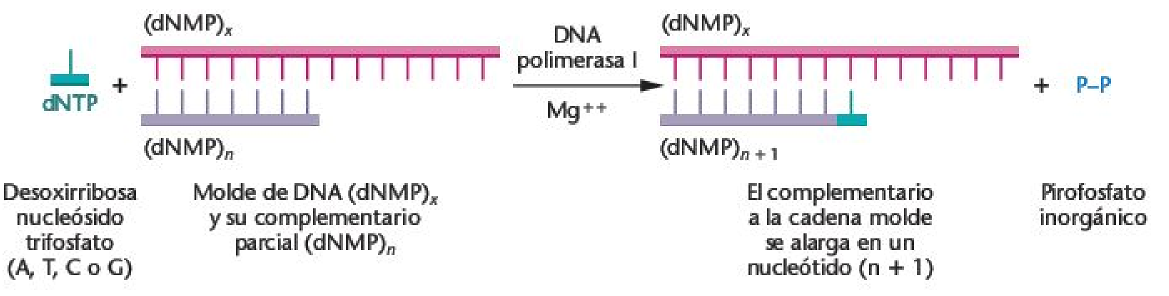


FIGURA 11.7 Reacción química catalizada por la DNA polimerasa I. En cada paso se añade un único nucleótido a la cadena en crecimiento, complementaria al molde de DNA, utilizando como substrato un nucleósido trifosfato. La liberación de pirofosfato inorgánico impulsa energéticamente la reacción.

La manera en que cada nucleótido se añade a la cadena en crecimiento es función de la especificidad de la DNA polimerasa I. Como se esquematiza en la Figura 11.8, el dNTP precursor contiene los tres grupos fosfato unidos al carbono 5′ de la desoxirribosa. Como durante la síntesis se cortan los dos fosfatos terminales, el fosfato restante unido al carbono 5′ se une covalentemente al grupo 3′-OH de la desoxirribosa a la que se añade el nucleótido. De este modo, el **alargamiento** («elongación») **de la cadena** se produce en **dirección 5′-3′** por la adición de nucleótidos al extremo 3′ en crecimiento. Cada paso proporciona un nuevo grupo 3′-OH expuesto que puede participar en la siguiente adición de un nucleótido a medida que prosigue la síntesis de DNA.

Después de mostrar cómo se sintetizaba el DNA, Kornberg quiso probar la exactitud, o fidelidad, con que la enzima había replicado el molde de DNA. Debido a que en 1957 no se podía determinar la secuencia nucleotídica del molde y de su producto, tuvo que basarse, inicialmente, en varios métodos indirectos.

Uno de los métodos de Kornberg fue comparar la composición de bases nitrogenadas del DNA molde con la del DNA producido. La Tabla 11.1 muestra el análisis de la composición de bases de Kornberg de tres moldes diferentes de DNA.

TABLA 11.1 COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA MOLDE Y DEL PRODUCTO DE REPLICACIÓN DE LAS PRIMERAS INVESTIGACIONES DE KORNBERG

Organismo	Molde o producto	%A	%T	%G	%C
T2	Molde	32,7	33,0	16,8	17,5
	Producto	33,2	32,1	17,2	17,5
E. coli	Molde	25,0	24,3	24,5	26,2
	Producto	26,1	25,1	24,3	24,5
Ternera	Molde	28,9	26,7	22,8	21,6
	Producto	28,7	27,7	21,8	21,8

Fuente: Kornberg (1960).

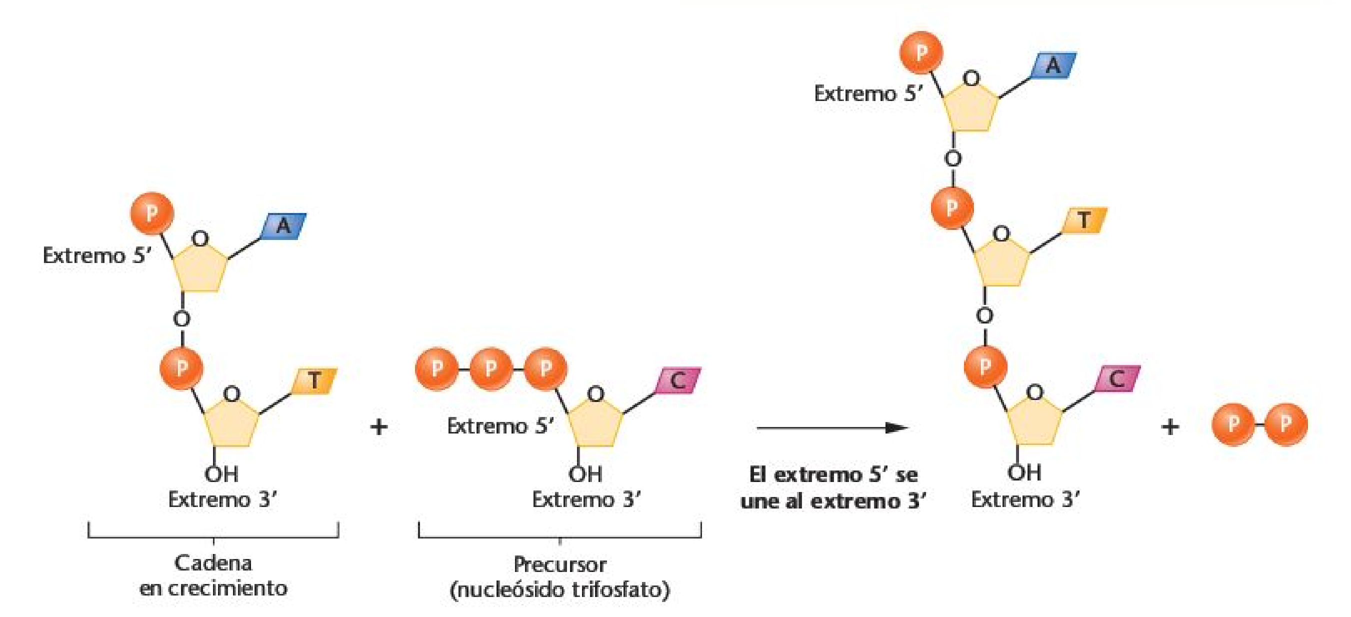


FIGURA 11.8 Descripción de la síntesis 5′-3′ de DNA.

Dentro de los márgenes del error experimental, la composición de bases de cada producto estaba de acuerdo con la del DNA molde utilizado. Estos datos, conjuntamente con otros tipos de comparaciones entre moldes y productos, sugerían que los moldes se habían replicado fielmente.

Ahora resuelva esto

El Problema 11.30 de la página 326 describe un proceso denominado análisis del vecino más cercano, una aproximación experimental que Kornberg utilizó para probar la fidelidad de copia de la DNA polimerasa I.

Sugerencia: Cuando analice este procedimiento, recuerde que durante la síntesis de DNA la DNA polimerasa I añade nucleótidos 5′ al grupo 3′-OH de la cadena polinucleotídica existente. Es decir, los nucleótidos se añaden por el grupo fosfato del C-5′ de la desoxirribosa. Sin embargo, la enzima fosfodiesterasa corta entre el fosfato y el átomo C-5′, por lo que produce nucleótidos 3′. En consecuencia, el grupo fosfato es transferido a su «vecino más cercano», siendo ésta la clave del análisis.

Síntesis de DNA biológicamente activo

A pesar del extenso trabajo de Kornberg, no todos los investigadores estaban convencidos de que la DNA polimerasa I fuese la enzima que replicase el DNA en el interior de la célula (*in vivo*). Las principales reservas se basaban en que la tasa de síntesis *in vitro* era mucho más lenta que la esperada *in vivo*, en que la enzima era mucho más efectiva replicando DNA de cadena sencilla que doble, y en que la enzima parecía capaz tanto de *degradar* el DNA como de *sintetizarlo*. Es decir, la enzima muestra actividad exonucleasa.

Encarado a la incertidumbre de la verdadera función celular de la DNA polimerasa I, Kornberg siguió otro enfoque. Razonó que si la enzima se puede utilizar para sintetizar *in vitro* **DNA biológicamente activo**, la DNA polimerasa I debería ser la fuerza catalizadora más importante para la síntesis de DNA en el interior de la célula. El término *actividad biológica* significa que el DNA sintetizado es capaz de realizar actividades metabólicas y de dirigir la reproducción del organismo del que originalmente se duplicó.

En 1967, Mehran Goulian, Robert Sinsheimer y Kornberg realizaron experimentos con el pequeño bacteriófago ϕX174. El fago ϕX174 proporciona un sistema experimental ideal ya que contiene como material genético una molécula de DNA muy pequeña (5386 nucleótidos), circular y de cadena sencilla. Durante el curso normal de una infección de ϕX174, el DNA circular y de cadena sencilla al que se hace referencia como **cadena (+)** entra en *E. coli* y sirve de molde para la síntesis de la **cadena (−)** complementaria. Las dos cadenas (+ y −) permanecen juntas en una doble hélice circular denominada **forma replicativa** (**RF**). La RF sirve de molde para su propia replicación, y posteriormente sólo se producen cadenas (+). Estas cadenas se empaquetan en proteínas de cubierta víricas para formar las partículas víricas maduras.

El experimento se diseñó cuidadosamente para que cada cadena sintetizada de nuevo pudiera distinguirse y aislarse de la cadena molde. El protocolo del experimento exigía que las cadenas (+) hubiesen sido sintetizadas *in vitro* bajo la dirección de la enzima de Kornberg.

La prueba esencial de actividad biológica se realizó utilizando el proceso de transfección (Capítulo 10), en el que se añadieron las nuevas cadenas (+) sintetizadas a protoplastos bacterianos (células bacterianas sin su pared). Después de la infección con el DNA sintético, se produjeron fagos maduros. El DNA sintético había dirigido con éxito la reproducción.

Esta demostración de actividad biológica representó una valoración precisa de la fidelidad de copia. Si se hubiese producido un solo error que alterara la secuencia de bases de cualquiera de los 5386 nucleótidos que formen el cromosoma de ϕX174, el cambio podría haber causado con facilidad una mutación que prohibiría la producción de fagos viables.

Las DNA polimerasas II, III, IV y V

Aunque el DNA sintetizado bajo la dirección de la polimerasa I demostró actividad biológica, en 1969 se suscitó una reserva más seria sobre la verdadera función biológica de la enzima. Paula DeLucia y John Cairns publicaron el descubrimiento de una cepa de *E. coli* que era deficiente para la actividad de la DNA polimerasa I. Esta mutación se denominó *polA1*. En ausencia de la enzima funcional, esta cepa mutante de *E. coli* todavía duplicaba su DNA y se reproducía con éxito. Sin embargo, estas células eran muy deficientes en su habilidad de reparar el DNA. Por ejemplo, la cepa mutante era muy sensible a la luz ultravioleta (UV) y a la radiación, que dañan el DNA y son mutagénicas. Las bacterias no mutantes pueden reparar una gran cantidad del daño inducido con UV.

Estas observaciones llevaron a dos conclusiones:

1. Debe haber al menos otra enzima presente en las células de *E. coli* que pueda replicar el DNA *in vivo*.
2. La DNA polimerasa I debe tener una función secundaria *in vivo*. Actualmente Kornberg y otros investigadores creen que esta función es esencial para la *fidelidad* de la síntesis del DNA, pero esta enzima no es la que realmente sintetiza la cadena complementaria.

Hasta la fecha, se han aislado cuatro DNA polimerasas a partir de células que no tienen actividad para la DNA polimerasa I y de células normales que sí contienen dicha actividad. En la Tabla 11.2 se comparan las características de la DNA polimerasa I con las de las **DNA polimerasas II y III**, con las de la DNA polimerasa I. Si bien ninguna de las tres puede *iniciar* la síntesis de DNA a partir de un molde, todas pueden *alargar* una cadena existente de DNA, denominada **cebador**.

Todas las enzimas con función DNA polimerasa son proteínas grandes y complejas con un peso molecular que sobre-

TABLA 11.2 PROPIEDADES DE LAS TRES DNA POLIMERASAS BACTERIANAS

Propiedades	I	II	III
Iniciación de la síntesis de la cadena	–	–	–
Polimerización 5′-3′	+	+	+
Actividad exonucleasa 3′-5′	+	+	+
Actividad exonucleasa 5′-3′	+	–	–
Moléculas de polimerasa/célula	400	?	15

pasa los 100.000 daltons. Las tres poseen **actividad exonucleasa** 3′-5′. Esto significa que pueden polimerizar en una dirección, pararse, invertir su marcha y escindir los nucleótidos que acaban de añadir. Como trataremos más tarde en este capítulo, esta actividad proporciona capacidad de «corrección de pruebas» del DNA recién sintetizado, eliminando y reemplazando los nucleótidos incorrectos.

La DNA polimerasa I también muestra actividad exonucleasa 5′-3′. Esta capacidad le permite escindir nucleótidos empezando por el extremo donde se inició la síntesis y continuando ésta en la misma dirección. Dos observaciones podrían explicar porqué Kornberg aisló la polimerasa I y no la polimerasa III: hay mucha más cantidad de polimerasa I que de polimerasa III, y es mucho más estable.

¿Cuál es la función de las tres polimerasas *in vivo*? La polimerasa III es la enzima responsable de la polimerización 5′-3′ esencial para la replicación *in vivo*. Su actividad exonucleasa 3′-5′ le proporciona la función de corrección de pruebas, que se activa cuando se inserta un nucleótido incorrecto. Cuando esto sucede, la síntesis se detiene y la polimerasa invierte su marcha, eliminando el nucleótido incorrecto. Después continua en dirección 5′-3′ sintetizando la cadena complementaria a la molde. Se cree que la polimerasa I es la responsable de eliminar el cebador y de la síntesis que rellena estos huecos. Su actividad exonucleasa también le permite participar en la reparación del DNA. La polimerasa II, junto con las polimerasas IV y V, participan en diversos aspectos de la reparación de DNA que ha sido dañado por agentes externos, como la luz ultravioleta. La polimerasa II está codificada por un gen que se activa al interrumpirse la síntesis de DNA en la horquilla de replicación.

Terminaremos esta sección poniendo énfasis en la complejidad de la molécula de la DNA polimerasa III. Su forma activa, llamada **holoenzima**, está formada un dímero de diez cadenas polipeptídicas distintas (véase la Tabla 11.3), y su peso molecular excede es de 900.000 daltons. La subunidad mayor, α, que tiene un peso molecular de 140.000 daltons, junto con otras dos subunidades (ϵ y θ), forma el «núcleo» enzimático responsable de la actividad polimerizadora de la holoenzima. La subunidad α es la responsable de la polimerización de los nucleótidos sobre las cadenas molde, mientras que la subunidad ϵ del núcleo enzimático es la que posee la actividad exonucleasa 3′-5′.

TABLA 11.3 SUBUNIDADES CONSTITUYENTES DE LA HOLOENZIMA DE LA DNA POLIMERASA III

Subunidad	Función	Agrupaciones
α	Polimerización 5′–3′	«Núcleo» enzimático: alargar la cadena polinucletídica y efectúa la corrección de pruebas
ϵ	Exonucleasa 3′–5′	
θ	Montaje del núcleo	
γ, δ, δ', χ, ψ	Carga de la enzima en el molde (sirve de abrazadera de carga)	Complejo γ
β	Abrazadera corrediza (factor de continuidad)	
τ	Dimeriza el complejo nuclear	

Un segundo grupo de cinco subunidades (γ, δ, δ', χ y ψ) forma el denominado complejo γ, que está implicado en «cargar» la enzima sobre el molde en la horquilla de replicación. Esta función enzimática requiere energía y es dependiente de hidrólisis de la ATP. La subunidad β actúa como abrazadera para evitar que el núcleo enzimático se separe del molde durante la polimerización. Finalmente, la función de la subunidad τ es dimerizar los dos núcleos de la polimerasa, lo que facilita la síntesis simultánea de ambas cadenas de la hélice en la horquilla de replicación. Esta holoenzima, junto con otras proteínas presentes en la horquilla de replicación, forman un complejo enorme (casi tan grande como un ribosoma) conocido como **replisoma**. Más adelante en esta capítulo se darán más detalles sobre la función de la DNA polimerasa III.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué descubrimientos sirven de base para concluir que la DNA polimerasa I (la enzima de Kornberg) no es la enzima para la replicación universal *in vivo* en bacterias como *E. coli*?

11.3 Durante la replicación del DNA se deben resolver muchas cuestiones complejas

Hasta ahora hemos establecido que en bacterias y en virus la replicación es semiconservativa y bidireccional en un solo replicón. También sabemos que la síntesis se produce en dirección 5′-3′ bajo la dirección de la DNA polimerasa III. La síntesis bidireccional forma dos horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas a partir del origen de la sín-

tesis. Como veremos en los siguientes puntos, todavía debemos resolver muchas cuestiones para establecer un modelo coherente sobre la replicación del DNA:

1. Debe existir un mecanismo mediante el que la hélice se desenrolle localmente y se estabilice en esta configuración «abierta», de manera que la síntesis pueda realizarse a lo largo de las dos cadenas de DNA.
2. A medida que va desenrollándose y sintetizándose el DNA, debe reducirse la tensión que el incremento de enrollamiento causa en la hélice.
3. Debe sintetizarse algún tipo de cebador para que pueda iniciarse la polimericación dirigida por la DNA polimerasa III. Sorprendentemente es el RNA y no el DNA quien sirve de cebador.
4. Una vez se han sintetizado los cebadores de RNA, la DNA polimerasa III inicia la síntesis de las moléculas complementarias de ambas cadenas parentales. Puesto que las dos cadenas son respectivamente antiparalelas, sólo es posible la síntesis continua de una de las cadenas en la dirección en que se mueve la horquilla de replicación. En la otra cadena, la síntesis es discontinua en la dirección opuesta.
5. Deben eliminarse los cebadores de RNA antes de que termine la replicación. Los huecos que temporalmente se forman deben rellenarse con DNA complementario al molde de cada sitio.
6. Las cadenas de DNA sintetizadas de nuevo que rellenan cada uno de los huecos temporales deben ser ligadas a la cadena de DNA adyacente.
7. Si bien durante la replicación la DNA polimerasa inserta con precisión las bases complementarias, no es perfecta por lo que, ocasionalmente se añaden bases incorrectas a la cadena en crecimiento. La presencia de un proceso de corrección de pruebas que corrija los errores es consubstancial a la síntesis de DNA.

Para ver como se resuelve cada una de estas cuestiones, a medida que las vayamos tratando examine las Figuras 11.9, 11.10, 11.11 y 11.12. La Figura 11.13 resume el modelo de síntesis del DNA.

11.4 La hélice de DNA debe desenrollarse

Como expusimos anteriormente, en el cromosoma circular de la mayoría de bacterias y virus hay un solo origen dónde se inicia la síntesis de DNA. Esta región se ha estudiado particularmente bien en el cromosoma de *E. coli*. El origen de replicación, denominado ***oriC***, está formado por 245 pares de bases y se caracteriza por la presencia de secuencias de 9 y 13 bases repetidas (denominadas **9meros** y **13meros**[1]). Como se muestra en

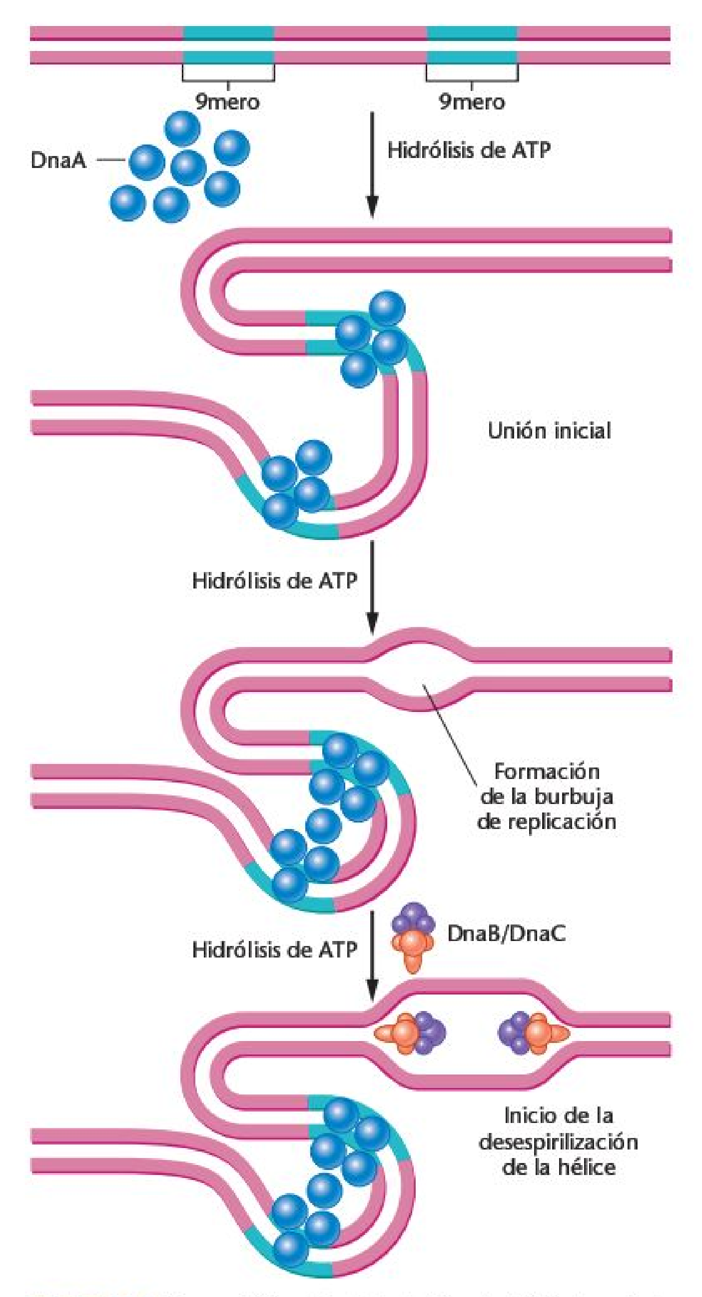


FIGURA11.9 Desespirilización de la hélice de DNA durante la replicación mediado por las proteínas DnaA, DnaB y DnaC. La unión inicial de muchos monómeros de DnaA se produce en sitios del DNA que contienen secuencias repetidas de 9 nucleótidos, denominadas *9meros*. No se muestran los *13meros*, que también están implicados.

la Figura 11.9, la proteína responsable del paso inicial en la desespiralización de la hélice es una proteína específica denominada **DnaA** (debido a que está codificada por el gen denominado *dnaA*). Unas cuantas subunidades de la proteína DnaA se unen a cada uno de los diversos 9meros. Este paso facilita la posterior unión de las proteínas **DnaB** y **DnaC**, que abren y desestabilizan más la hélice. Estas proteínas, que precisan la energía suministrada normalmente por la hidrólisis de ATP para romper

[1] *Nota del traductor:* estas secuencias repetidas de 9 y 13 bases se denominan, en inglés, *9mers* y *13mers* respectivamente. En castellano deberían pronunciarse **nonómeros (9meros)** y **trecémeros (13meros)**.

los puentes de hidrógeno y desnaturalizar la doble hélice, se denominan **helicasas**. Otras proteínas, denominadas **proteínas de unión a cadena sencilla** (**SSBP**, del inglés *single-stranded binding proteins*), estabilizan esta conformación.

Al proseguir la desespiralización, se produce un tensión de enrollamiento por delante de la horquilla de replicación, lo que a menudo produce un **superenrollamiento**. En una molécula de DNA circular los superenrollamientos pueden adquirir la forma de giros de DNA, parecido al enrollamiento que se formaría en una goma elástica al sostener un extremo y enrollar el otro. La acción de la **DNA girasa,** una enzima que pertenece al gran grupo conocido con el nombre de las **DNA topoisomerasas,** puede relajar dicho superenrollamiento. La girasa hace «cortes» en una o en las dos cadenas, y cataliza movimientos locales que tienen el efecto de «deshacer» los giros y los nudos que se han formado durante el superenrollamiento. Entonces se liberan las cadenas. Estas reacciones precisan la energía liberada durante la hidrólisis de ATP para llevarse a cabo.

En conjunto, el DNA, el complejo de la polimerasa y las enzimas asociadas constituyen un grupo ordenado de moléculas que participan en la síntesis del DNA y que son parte de lo que previamente hemos llamado replisoma.

11.5 La iniciación de la síntesis de DNA precisa un cebador de RNA

Una vez una pequeña porción de la hélice está desenrollada, la iniciación de la síntesis puede ocurrir. Como se ha mencionado anteriormente, la DNA polimerasa III necesita un extremo 3´-hidroxil libre en el cebador para alargar la cadena polinucleotídica. Puesto que un cromosoma circular no tiene ningún extremo disponible, esto impulsó a los científicos a investigar cómo se puede añadir el primer nucleótido. Actualmente no hay dudas de que el RNA sirve de cebador para iniciar la síntesis de DNA.

Primero se sintetiza un segmento corto de RNA (de 5 a 15 nucleótidos de longitud) complementario al DNA de la cadena molde. El RNA se sintetiza bajo la dirección de un tipo de RNA polimerasa denominada **primasa**, que no precisa un extremo 3′ libre para iniciar la síntesis. Es a este corto segmento de RNA al que la DNA polimerasa empieza a añadir 5′-desoxirribonucleótidos, iniciando la síntesis de DNA. La Figura 11.10 muestra un diagrama conceptual de la iniciación

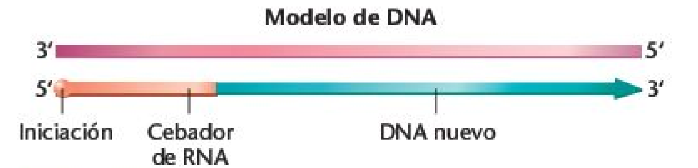


FIGURA 11.10 Inicio de la síntesis de DNA. Primero se sintetiza un cebador de RNA, al que se añade el DNA. La síntesis se produce en dirección 5′-3′. Al proceder la síntesis, la DNA polimerasa I dirige el reemplazamiento del cebador de RNA por DNA.

sobre un molde de DNA. Posteriormente, el cebador de RNA debe ser cortado y reemplazado por DNA. Se cree que es la DNA polimerasa I quien dirige este proceso. Los cebadores de RNA han sido encontrados en virus, en bacterias y en varios organismos eucariotas, y se cree que es un fenómeno universal para la iniciación de la síntesis de DNA.

11.6 Las cadenas antiparalelas precisan síntesis de DNA continua y discontinua

Debemos reconsiderar ahora el hecho de que las dos cadenas de DNA de una doble hélice son **antiparalelas** entre sí. Es decir, una discurre en dirección 5′-3′, mientras que la otra tiene la polaridad 3′-5′ opuesta. Debido a que la DNA polimerasa III sintetiza DNA sólo en dirección 5′-3′, la síntesis simultánea de cadenas antiparalelas durante el avance de la horquilla de replicación ocurre en una dirección en una cadena y en la dirección opuesta en la otra.

En consecuencia, al desenrollarse las cadenas y avanzar la horquilla de replicación por la hélice (Figura 11.11), sólo una cadena puede servir de molde para la **síntesis continua de DNA**. Esta cadena recién sintetizada se denomina **cadena líder**. Al avanzar la horquilla, se necesitan muchos puntos de iniciación en la cadena opuesta, lo que da lugar a una **síntesis discontinua de DNA** en la **cadena retrasada**[2].

Reiji y Tuneko Okazaki proporcionaron las pruebas que apoyaban la síntesis discontinua del DNA. Descubrieron que cuando se replica el DNA de un bacteriófago en *E. coli*, algunos de los DNA recién formados, que están unidos por puentes de hidrógeno a la cadena molde, son pequeños fragmentos de 1.000 a 2.000 nucleótidos. Cebadores de RNA forman parte de todos estos fragmentos. Al proseguir la síntesis, estos fragmentos, denominadas **fragmentos de Okazaki**, se van convirtiendo en cadenas de DNA cada vez más largas y con un mayor peso molecular.

La síntesis discontinua de DNA precisa enzimas para eliminar el cebador de RNA y para unir los fragmentos de Okazaki en la cadena retrasada. Como ya se ha dicho, la DNA polimerasa I elimina el cebador y reemplaza los nucleótidos perdidos. La unión de los fragmentos es tarea de la **DNA ligasa**, que puede catalizar la formación del enlace fosfodiéster que sellan los huecos existentes entre las cadenas sintetizadas de manera discontinua. Las pruebas de que la DNA ligasa realiza esta función durante la síntesis de DNA se ven reforzadas por las observaciones de una cepa mutante de *E. coli* deficiente para la ligasa (*lig*), la cual un gran número de fragmentos de Okazaki no unidos.

[2] Puesto que la síntesis de DNA es contínua en una cadena y discontínua en la otra, a veces se utiliza el término **síntesis semidiscontinua** para describir el proceso en su conjunto.

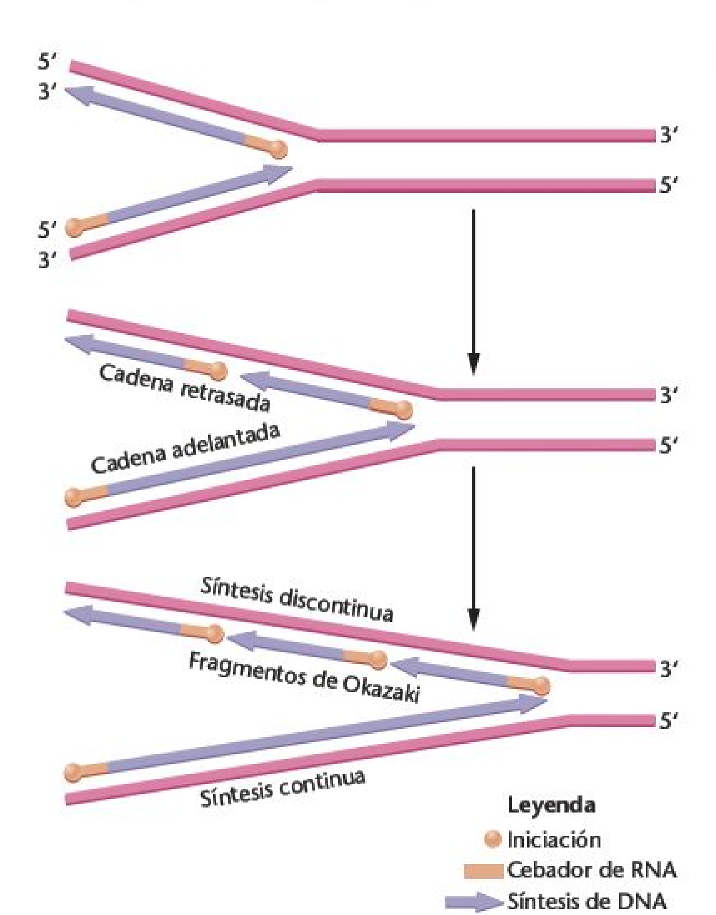


FIGURA 11.11 Esquema de la polaridad opuesta de la síntesis de DNA en las dos cadenas, necesaria porque las dos cadenas son antiparalelas entre sí y la DNA polimerasa III sintetiza en una única dirección (5′-3′). En la cadena retrasada, la síntesis debe ser discontinua, resultando en la producción de fragmentos de Okazaki. En la cadena líder, la síntesis es continua. Se utilizan cebadores de RNA para iniciar la síntesis en ambas cadenas.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que durante la replicación la síntesis de DNA es discontinua sobre una de las dos cadenas molde?

11.7 La síntesis en las cadenas adelantada y retrasada es simultánea

Dado el modelo anterior, podemos preguntarnos cómo la DNA polimerasa III lleva a cabo la síntesis de DNA de la cadena líder y de la retrasada. ¿Pueden replicarse simultáneamente las dos cadenas en la horquilla de replicación, o son dos sucesos distintos que implican la presencia de dos copias separadas de la enzima? Las pruebas sugieren que ambas cadenas se pueden replicar simultáneamente. Como se esquematiza en la Figura 11.12, si la cadena retrasada forma un bucle, la polimerización de los nucleótidos se puede producir sobre ambas cadenas molde bajo la dirección de un único dímero de la enzima. Tras la síntesis de 100 a 200 pares de bases, el monómero de la enzima que se encuentra en la cadena retrasada encontrará un fragmento de Okazaki completo, liberando la cadena retrasada. Entonces se forma un nuevo bucle con la cadena molde retrasada, y se repite el proceso. El bucle invierte la orientación del molde, pero no la dirección real de la síntesis de la cadena retrasada, que siempre es en dirección 5′-3′.

Otra característica importante de la holoenzima que facilita la síntesis en la horquilla de replicación en el dímero de la subunidad β, que forma una abrazadera alrededor del dúplex de DNA recién formado. Esta abrazadera de la subunidad β evita que el núcleo de la enzima (las subunidades α, ζ, θ, que son las responsables de catalizar la adición de nucleótidos) se desprenda del molde al proseguir la polimerización. Puesto que toda la holoenzima se mueve a lo largo del dúplex progenitor, adelantando la horquilla de replicación, se alude a menudo al dímero de la subunidad β como abrazadera deslizante.

Ahora resuelva esto

El Problema 11.33 de la página 327 se presenta un organismo hipotético en el que no se producen fragmentos de Okazaki, por lo que existen problemas en los telómeros. Se le pregunta que sugiera un modelo congruente con estas dos características.

Sugerencia: Esta observación sugiere que la síntesis del DNA es continua en ambas cadenas.

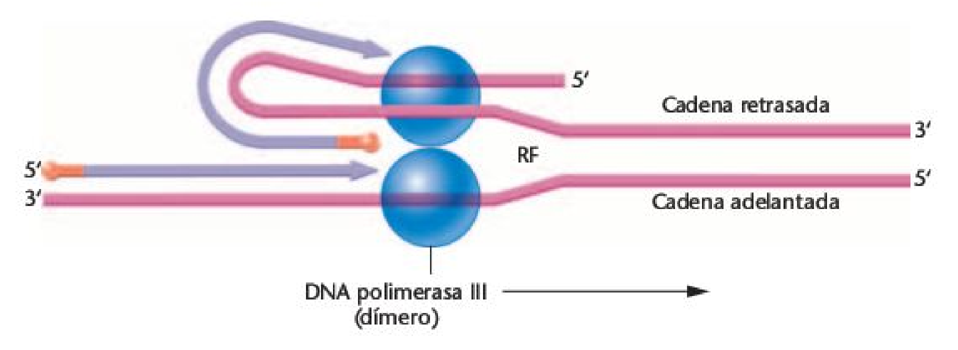


FIGURA 11.12 Esquema de cómo se puede lograr la síntesis simultánea de las cadenas líder y retrasada en una única horquilla de replicación. La cadena molde retrasada forma un «lazo» para invertir la dirección física de la síntesis, pero no la bioquímica. La enzima funciona en forma dimérica, en la que cada núcleo de la enzima realiza la síntesis de una de las cadenas.

11.8 La corrección de pruebas y la eliminación de errores son parte consubstancial de la replicación del DNA

El puntal de la replicación semiconservativa es la síntesis de una nueva cadena de DNA que sea exactamente complementaria a la cadena molde para cada posición nucleotídica. Aunque la acción de la DNA polimerasa es muy precisa, la síntesis no es perfecta por lo que a veces un nucleótido no complementario se inserta por error. Para compensar dichas inexactitudes, todas las polimerasas poseen actividad exonucleasa 3′-5′. Esta característica las capacita para detectar y escindir un nucleótido mal emparejado (en dirección 3′-5′). Una vez se ha escindido este nucleótido, la síntesis 5′-3′ puede proseguir una 100 veces. Este proceso, denominado **corrección de pruebas**, incrementa la fidelidad de la síntesis. Para la holoenzima de la DNA polimerasa III, la subunidad directamente implicada en la corrección de pruebas es la epsilon (ϵ). En cepas de *E. coli* que tienen una mutación que hace que la subunidad ϵ no sea funcional, la tasa de error (la tasa de mutación) durante la síntesis de DNA incrementa considerablemente.

11.9 Un modelo coherente resume la replicación del DNA

Ahora podemos combinar los diversos aspectos de la replicación del DNA que se producen en una horquilla de replicación en un modelo coherente, como se muestra en la Figura 11.13. Al avanzar la horquilla, una helicasa desenrolla de doble hélice. Una vez desenrollada, las proteínas de unión a cadena sencilla se asocian a las cadenas, evitando que la doble hélice se vuelva a formar. La DNA girasa actúa por delante de la horquilla de replicación para disminuir la tensión que se genera al superenrollarse la hélice. Cada mitad de la polimerasa dimérica es un núcleo enzimático que se encuentra unido a una de las cadenas molde por la abrazadera deslizante de la subunidad β. En la cadena adelantada se produce síntesis continua, mientras que la cadena retrasada debe formar un bucle alrededor de la enzima para que la síntesis sea simultánea en ambas cadenas. Aunque no se muestra en la figura, para la replicación de la cadena retrasada es esencial la acción de la DNA polimerasa I y de la DNA ligasa, que actúan conjuntamente para reemplazar el cebador de RNA y unir los fragmentos de Okazaki, respectivamente.

Puesto que la investigación de la síntesis de DNA es todavía un campo extremadamente activo, sin duda este modelo se ampliará en el futuro. Mientras tanto, proporciona un resumen de la síntesis de DNA que permite interpretar los fenómenos genéticos.

11.10 La replicación es controlada por una variedad de genes

Gran parte de lo que se conoce sobre la replicación del DNA en virus y en bacterias se basa en el análisis genético de dicho proceso. Por ejemplo, ya hemos tratado los estudios de la mutación *polA1*, que reveló que la DNA polimerasa I no es la principal enzima responsable de la replicación. Hay muchas otras mutaciones que interrumpen o perjudican seriamente algún aspecto de la replicación, como las mutaciones de deficiencia de ligasa y de deficiencia de corrección de pruebas mencionadas anteriormente. Puesto que muchas de ellas son letales, el análisis genético utiliza con frecuencia **mutaciones condicionales**, que se expresan bajo una determinada condición pero no bajo otra condición diferente. Por ejemplo, puede que una **mutación sensible a la temperatura** no se exprese a una temperatura concreta *permisiva*. Cuando una célula mutante crece a temperatura *restrictiva*, expresa el fenotipo mutante, por lo que puede ser estudiado. Al examinar el efecto de la pérdida de función asociada a la mutación, la investigación de estos mutantes sensibles al calor puede proporcionar ideas del producto y de la función asociada al gen normal, no mutante.

Como se muestra en la Tabla 11.4, *E. coli* presenta diversos genes que especifican las subunidades de las DNA polimerasas, y que codifican productos implicados en especificar

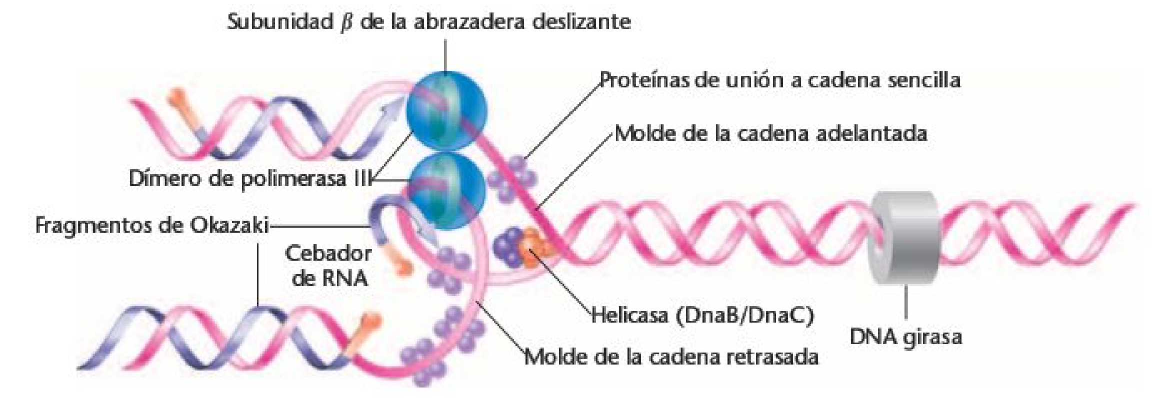


FIGURA 11.13 Resumen esquemático de la síntesis de DNA en una horquilla de replicación. Se muestran diversas enzimas y proteínas esenciales para este proceso.

TABLA 11.4 **ENUMERACIÓN DE ALGUNOS GENES MUTANTES DE *E. COLI* Y DE SUS PRODUCTOS O FUNCIONES DURANTE LA REPLICACIÓN**

Gen mutante	Enzima o función
polA	DNA polimerasa I
polB	DNA polimerasa II
dnaE, N, Q, X, Z	Subunidades de la DNA polimerasa III
dnaG	Primasa
dnaA, I, P	Iniciación
dnaB, C	Helicasa en *oriC*
oriC	Origen de replicación
gyrA, B	Subunidades de la girasa
lig	Ligasa
rep	Helicasa
ssb	Proteínas de unión a cadena sencilla
rpoB	Subunidad de la RNA polimerasa

el origen de la síntesis, de desenrollar la hélice y estabilizarla, de la iniciación y síntesis de los cebadores, de la relajación del superenrollamiento, de la reparación y de la ligación. El descubrimiento de un grupo tan grande de genes atestigua la complejidad del proceso de replicación, incluso en los relativamente simples procariotas. Esta complejidad no es inesperada, dada la enorme cantidad de DNA que debe replicarse sin errores en un tiempo muy breve. Como veremos en la siguiente sección, el proceso en eucariotas es incluso más complicado y por tanto más difícil de investigar.

Ahora resuelva esto

El Problema 11.25 de la página 325 involucra a diversas mutaciones sensibles a la temperatura en *E. coli*, y se le pide que interprete la acción del gen que ha mutado según el fenotipo que resulta.

Sugerencia: Cada mutación ha interrumpido uno de los muchos pasos esenciales para la síntesis de DNA. En cada caso, el fenotipo mutante proporciona la clave en cuanto a qué enzima o función se ve afectada.

11.11 La síntesis de DNA en eucariotas es parecida a la síntesis en procariotas, aunque más compleja

Diversas investigaciones han demostrado que el DNA eucariótico se replica de manera parecida al de bacterias. En ambos sistemas, el DNA de doble cadena se desenrolla en los orígenes de replicación, se forman horquillas de replicación y la síntesis bidireccional de DNA genera cadenas adelantadas y retrasadas a partir de DNA molde, bajo la dirección de DNA polimerasa. Las polimerasas eucarióticas tienen los mismos requisitos funcionales para sintetizar DNA que las bacterianas: cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, un molde y un cebador. Sin embargo, debido a que las células eucarióticas contienen mucho más DNA en cada célula, a que su cromosoma es lineal en vez de circular, y a que este DNA está acomplejado con proteínas, los eucariotas se enfrentan con muchos problemas con los que las bacterias no se encuentran. Por eso el proceso de síntesis de DNA en eucariotas es mucho más complejo y más difícil de estudiar en eucariotas. No obstante, actualmente se conoce mucho sobre este proceso.

Múltiples orígenes de replicación

La diferencia más obvia entre la replicación de DNA en eucariotas y procariotas es que los cromosomas eucariotas contienen múltiples orígenes de replicación, en comparación con el único sitio presente en el cromosoma de *E. coli*. Estros orígenes múltiples, visibles al microscopio electrónico como «burbujas de replicación» (Figura 11.14), se forman al abrirse la hélice, y proporcionan cada uno dos potenciales horquillas de replicación. La presencia de múltiples orígenes es esencial si debe completarse la replicación de todo el genoma de un eucariota típico en un tiempo razonable. Recuerde que (1) los eucariotas tienen mucho más DNA que las bacterias (p.e., las levaduras tienen 4 veces más DNA que *E. coli* y *Drosophila* 100 veces más), y (2) la velocidad de síntesis de la DNA polimerasa eucariótica es mucho más lenta, sólo unos 2000 nucleótidos por minuto, lo que supone una velocidad 25 veces menor que su equivalente bacteriano. Bajo estas condiciones, en un eucariota típico la replicación a partir de un único origen tardaría 2 días en completarse! Sin embargo, la replicación de un genoma eucariótico completo se suele realizar en cuestión de horas.

Actualmente se dispone de datos sobre la naturaleza molecular de los orígenes múltiples y de la iniciación de la síntesis

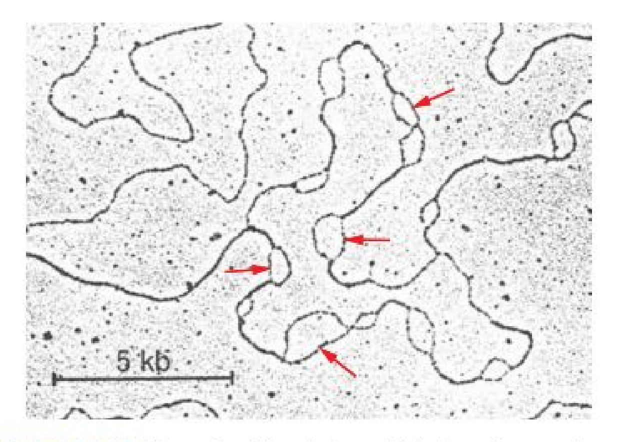


FIGURA 11.14 Demostración de los múltiples orígenes de replicación a lo largo de un cromosoma eucariótico. Se puede ver cada origen como una burbuja de replicación a lo largo del eje del cromosoma. Las flechas señalan algunas de estas burbujas de replicación.

de DNA en estos sitios. La mayor parte de esta información se obtuvo originalmente a partir de estudios en levaduras (p.e., *Saccharomyces cerevisiae*), que tiene entre 250 y 400 replicones por genoma; estudios posteriores han utilizado células de mamífero, que tienen hasta 25.000 replicones. Se han aislado los orígenes de levadura, y se han denominado **secuencias de replicación autónomas** (**ARSs**). Forman una unidad que contiene una secuencia consenso de 11 pares de bases, flanqueada por otras secuencias cortas implicadas en la eficiencia de iniciación. Como vimos en el Capítulo 2, la síntesis de DNA se restringe a la fase S del ciclo celular eucariótico. Diversas investigaciones han mostrado que no se activan muchos orígenes a la vez, sino que se activan grupos de 20 a 80 replicones adyacentes de manera secuencial durante toda la fase S, hasta que se ha replicado todo el DNA.

Obviamente, cómo encuentra la polimerasa los ARSs entre tanto DNA es una cuestión de reconocimiento. La solución implica un mecanismo que se inicia antes de la fase S. Durante la fase G1 del ciclo celular, todas las ARSs se encuentran unidas a un grupo de proteínas específicas (6 en levadura) que forman el denominado **complejo de reconocimiento del origen** (**ORC**). Mutaciones en los ARSs o en cualquiera de los genes que codifican las proteínas de los ORC anulan o reducen la iniciación de la síntesis de DNA. Dado que estos complejos de reconocimiento se forman en G1, pero la síntesis no empieza hasta la fase S, debe haber otras proteínas implicadas en la señal real de iniciación. De estas, las más importantes son quinasas específicas, unas enzimas clave implicadas en fosforilación que forman parte integrante del control del ciclo celular. Cuando se unen a la ORC se forma un complejo de prerreplicación que es accesible a la DNA polimerasa. La activación de estas quinasas sirve para completar el complejo de iniciación, las cuales dirigen la desespirilización localizada del DNA y estimulan su síntesis. Esta activación también inhibe la formación de nuevos complejos de prerreplicación cuando la síntesis de DNA se ha completado en cada replicón. Este mecanismo es importante puesto que distingue los segmentos de DNA que han completado su replicación de los que no se han replicado, lo que mantiene la replicación ordenada y eficiente. Esto asegura que la replicación ocurra sólo una vez en cada trecho de DNA durante cada ciclo celular.

DNA polimerasas eucarióticas

El aspecto más complejo de la replicación en eucariotas es la colección de polimerasas implicadas en la dirección de la síntesis de DNA. Como veremos, se han aislado y estudiado muchas formas distintas de cada enzima. Sin embargo, solo cuatro están implicadas en la replicación del DNA, mientras que las restantes lo están en los procesos de reparación. Para que las polimerasas tengan acceso al DNA, primero debe modificarse la topología de la hélice. Al estimularse la síntesis en cada sitio de origen, las dobles cadenas se abren por una región rica en AT, lo que permite la entrada de una enzima helicasa que desenrolla todavía más la doble cadena de DNA. Antes de que las polimerasas puedan empezar la síntesis, las proteínas histónicas acomplejadas al DNA (que forman los nucleosomas característicos de la cromatina y se tratan en el Capítulo 12) también deben ser eliminadas o si no modificadas. Al proseguir la síntesis de DNA, las histonas se reasocian con los dúplex recién formados, reestableciéndose el patrón característico de nucleosomas (Figura 11.15). En los eucariotas, la síntesis de nuevas proteínas histónicas está estrechamente emparejada a la síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular.

En la Tabla 11.5 se resumen la nomenclatura y las características de las 6 distintas polimerasas. De ellas, tres (Pol α, δ y ϵ) son imprescindibles para la replicación del DNA nuclear en las células eucarióticas. Se cree que dos de ellas (pol β y ζ) están implicadas en la reparación del DNA (y se han descubierto más formas implicadas en la reparación). La sexta forma (Pol γ) está implicada en la síntesis de DNA mitocondrial. Probablemente

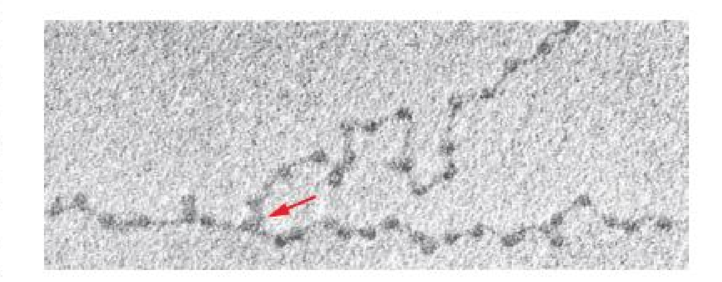


FIGURA 11.15 Micrografía electrónica de una horquilla de replicación eucariótica que muestra la presencia de nucleosomas con proteínas histónicas en ambos brazos.

TABLA 11.5 PROPIEDADES DE LAS DNA POLIMERASAS EUCARIÓTICAS

	Polimerasa α	Polimerasa β	Polimerasa δ	Polimerasa ϵ	Polimerasa γ	Polimerasa ζ
Localización	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo
3′–5′ Actividad exonucleasa	No	No	Sí	Sí	Sí	No
¿Esencial para la replicación nuclear?	Sí	No	Sí	Sí	No	No

su función en replicación se limita el DNA de este orgánulo, a pesar de que está codificada por un gen nuclear. Todas las formas de la enzima excepto una (la forma β) están formadas por múltiples subunidades. Las distintas subunidades realizan diferentes funciones durante la replicación.

Pol α y δ son las formas principales de la enzima implicadas en la iniciación y la elongación durante la síntesis de DNA nuclear, por lo que nos centraremos en estas dos. Dos de las cuatro subunidades de la enzima Pol α participan en la síntesis de los cebadores de RNA durante la iniciación de la síntesis de las cadenas adelantada y retrasada. Tras la adición de unos 10 ribonucleótidos, otra subunidad alarga el primer de RNA añadiendo de 20 a 30 desoxirribonucleótidos complementarios. Se dice que Pol α posee una baja **progresividad**, un término que refleja la longitud del trecho de DNA que esta enzima sintetiza antes de separarse del molde. Cuando el cebador está en su sitio, se produce un suceso llamado **cambio de polimerasa**, porque Pol α se separa del molde siendo reemplazada por Pol δ. Esta forma de la enzima posee una alta progresividad, y elonga las cadenas adelantada y retrasada. También posee actividad exonucleasa 3′-5′, lo que le proporciona el potencial para la corrección de pruebas. Pol ϵ, la tercera forma imprescindible, posee las mismas características generales que Pol δ, pero se piensa que funciona bajo condiciones celulares diferentes, o que está restringida a la síntesis de la cadena retrasada. En levaduras, las mutaciones que dejan a Pol ϵ inactiva son letales, lo que pone de manifiesto su función esencial durante la replicación.

El proceso descrito sirve tanto para la síntesis de la cadena adelantada como para la de la retrasada. En ambas cadenas los cebadores de RNA deben ser reemplazados por DNA. En la cadena retrasada deben unirse los fragmentos de Okazaki, que en eucariotas son unas 10 veces más pequeños que en procariotas (de 100 a 500 nucleótidos).

Para satisfacer el mayor número de replicones, las células eucarióticas contienen muchas más moléculas de polimerasa que las bacterias. Mientras que *E. coli* tiene unas 15 moléculas de DNA polimerasa III por célula, en células animales hay hasta 50.000 copias de la forma α de la DNA polimerasa. Como se ha dicho, la presencia de un número mayor de replicones más pequeños en los eucariotas en comparación con las bacterias compensa la menor velocidad de síntesis de DNA en los primeros. *E. coli* requiere de 20 a 40 minutos para replicar su cromosoma, mientras que *Drosophila*, que contiene 40 veces más DNA, tarda solo 3 minutos en realizar la misma tarea durante las divisiones celulares embrionarias.

11.12 Los extremos de los cromosomas eucarióticos son problemáticos durante la replicación

Un aspecto final de la síntesis de DNA entre eucariotas y procariotas hace referencia a la naturaleza de los cromosomas. A diferencia de los cromosomas circulares cerrados de las bacterias y de la mayoría de bacteriófagos, los cromosomas eucarióticos son lineales. Durante la replicación, estos cromosomas se encaran con un problema especial en los «extremos» de estas moléculas lineales, los denominados **telómeros**.

Antes de abordar este problema, es necesario establecer diversas características de los telómeros. Estas estructuras están formadas por largos trechos de cortas secuencias repetidas de DNA unidas a **proteínas asociadas a los telómeros** específicas. Esta cualidad única de los telómeros sirve para preservar la integridad y la estabilidad de los cromosomas. Los telómeros son esenciales porque los extremos de las moléculas de DNA de doble cadena que hay al final de los cromosomas se parecen a las denominadas **roturas de la doble cadena** (**DSBs**, del inglés *double-stranded breaks*), que pueden producirse si el interior del cromosoma se rompe. En este caso, los extremos de doble cadena resultantes pueden fusionarse a otros extremos parecidos o, en caso contrario, son vulnerables a la degradación. De este modo, se cree que los telómeros protegen los extremos de los cromosomas eucarióticos intactos de este destino.

Ahora consideremos la replicación semiconservativa cerca del extremo de una molécula de DNA de doble cadena. Mientras que la síntesis de la cadena líder puede proseguir con normalidad hasta su extremo, una vez se ha eliminado el cebador de RNA de la cadena retrasada surge un problema (Figura 11.16). Normalmente, el hueco recién creado se rellena normalmente por adición de un nucleótido al grupo 3′-OH libre

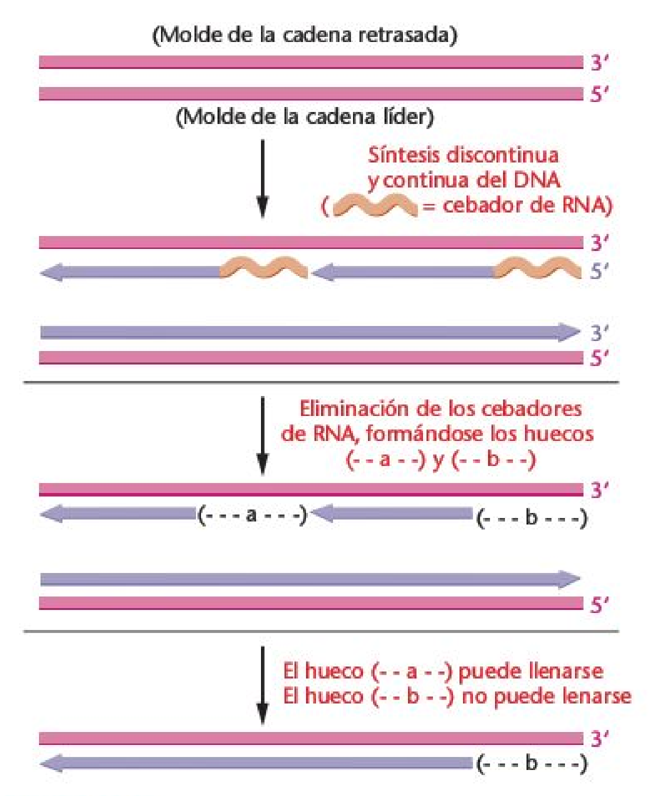


FIGURA 11.16 Esquema que muestra la dificultad encontrada durante la replicación de los extremos de los cromosomas lineales. Queda un hueco (- -b- -) después de la síntesis de la cadena retrasada.

proporcionado durante la síntesis discontinua (a la derecha del hueco (b) en la Figura 11.16). Sin embargo, no hay ninguna cadena que proporcione el grupo 3′-OH porque éste es el extremo del cromosoma. Como consecuencia, el hueco de la cadena retrasada no se rellena, por lo que, en teoría, cada sucesiva ronda de síntesis acortaría el cromosoma una longitud igual a la del cebador de RNA. Debido a que esto es un problema importante, podemos suponer que pronto en la evolución se habría dispuesto una solución molecular que estaría conservada y compartida por casi todos los eucariotas, lo que ciertamente es así.

Una enzima eucariótica especial denominada **telomerasa**, que fue descubierta inicialmente en el protozoo ciliado *Tetrahymena*, nos ha ayudado a entender la solución. Antes de ver cómo funciona realmente esta enzima, veamos qué consigue. Como se ha dicho, en eucariotas el DNA telomérico siempre está formado por muchas secuencias nucleotídicas cortas repetidas. Por ejemplo, el molde que produce la cadena retrasada en el extremo del cromosoma de *Tetrahymena* contiene muchas repeticiones de la secuencia 5′-TTGGGG-3′.

Como se muestra en la Figura 11.17, la telomerasa puede añadir repeticiones de esta secuencia de seis nucleótidos al extremo 3′ de la cadena retrasada (utilizando síntesis 5′-3′), lo que evita el acortamiento del cromosoma. Estas repeticiones se doblan sobre sí mismas formando una «horquilla» que se estabiliza mediante puentes de hidrógeno no ortodoxos entre residuos de guanina opuestos (G═G), generando un grupo 3′-OH libre en el extremo de la horquilla que puede servir de substrato para la DNA polimerasa I. Esto posibilita que posteriormente se rellene el hueco, que de otra forma acortaría el cromosoma. Entonces se puede cortar el extremo de la horquilla, evitándose la pérdida potencial de DNA en cada ciclo posterior de replicación.

Investigaciones detalladas realizadas por Elizabeth Blackburn y Carol Greider sobre cómo la enzima telomerasa de *Tetrahymena* realiza la síntesis condujeron a un hallazgo extraordinario. Es una enzima muy atípica en el sentido de que es una *ribonucleoproteína*, cuya estructura molecular contiene un fragmento corto de RNA que es esencial para su actividad catalítica. El componente de RNA sirve de «guía» y de molde para la síntesis de su complementario de DNA, un proceso denominado *transcripción reversa*. En *Tetrahymena*, el RNA contiene varias repeticiones de la secuencia 5′-CCCCAA-3′, la complementaria de la secuencia de DNA telomérico repetida que debe sintetizarse (5′-TTGGGG-3′).

Se puede suponer que parte de la secuencia de RNA de la enzima se empareja con las bases del DNA telomérico, y el resto de RNA se solapa con el extremo de la cadena retrasada. La transcripción reversa de esta secuencia solapada, que sintetizará DNA sobre el molde de RNA, conducirá a la extensión de la cadena retrasada, como se esquematiza en la Figura 11.17. Se cree que entonces la enzima se transloca al extremo de la cadena retrasada, repitiéndose esta secuencia de sucesos. En levadura, cuya síntesis de DNA telomérico se ha investigado en detalle, hay proteínas específicas responsables de la terminación de la síntesis, determinando de este modo el número de unidades repetidas añadidas al extremo de la cadena retrasada. No hay duda de que proteínas parecidas ejercen la misma función en otros eucariotas.

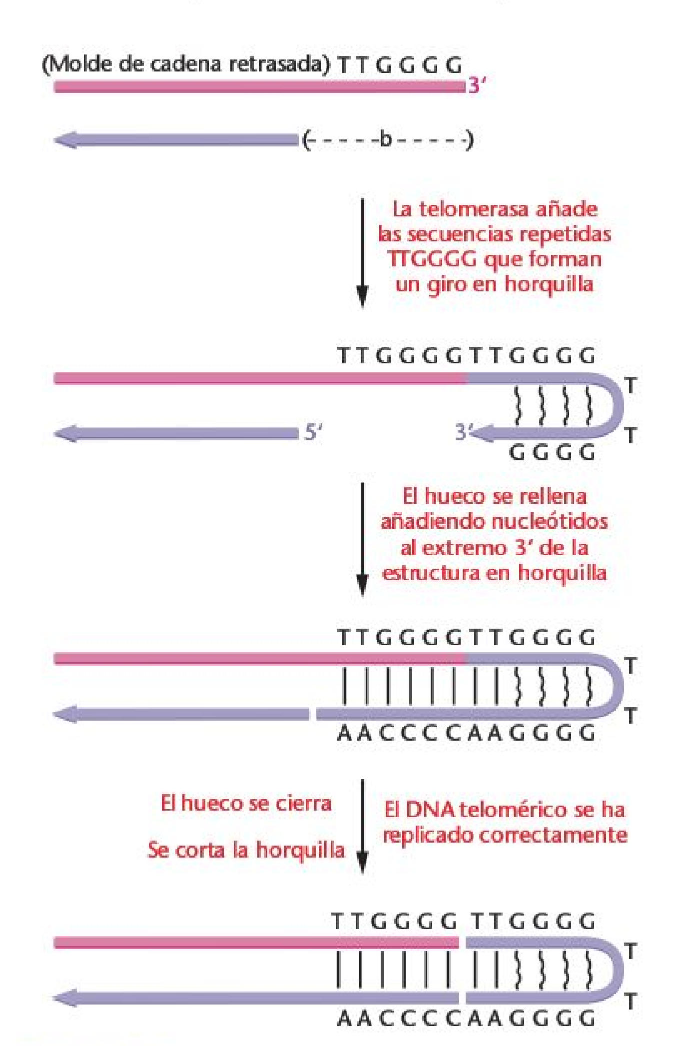


FIGURA 11.17 Esquema de la solución predicha al problema planteado en la Figura 11.16. La enzima telomerasa dirige la síntesis de la secuencia TTGGGG, que da por resultado la formación de una estructura en horquilla. De este modo puede rellenarse el hueco y, tras cortar el extremo de la horquilla, el proceso evita la creación de un hueco durante la replicación de los extremos de los cromosomas lineales.

Actualmente se han encontrado funciones enzimáticas análogas en todos los eucariotas estudiados. En humanos, la secuencia de DNA telomérico que genera la cadena retrasada y que se repite es 5′-TTAGGG-3′, la cual difiere de la de *Tetrahymena* en un solo nucleótido.

Como veremos en el Capítulo 12, las secuencias de DNA telomérico se han conservado enormemente durante la evolución, lo que refleja la función crítica de los telómeros. En el ensayo que hay al final de este capítulo veremos que se ha asociado el acortamiento de los telómeros al mecanismo molecular de envejecimiento celular. De hecho, en la mayoría de

células eucarióticas somáticas, la telomerasa no está activa, por lo que en cada división celular los telómeros de cada cromosoma se acortan. Tras muchas divisiones, el telómero está seriamente erosionado, y la célula pierde la capacidad de dividirse más. Las células malignas, en cambio, mantienen la actividad de la telomerasa y se inmortalizan.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos experimentalmente que de hecho los eucariotas tienen un problema en los telómeros durante la replicación del DNA?

11.13 La recombinación del DNA, como la replicación, es dirigida por diversas enzimas

Ahora trataremos un tema que ya se discutió en el Capítulo 5 —la recombinación genética. En él se indicó que el proceso de entrecruzamiento depende de la rotura y unión de cadenas de DNA entre cromosomas homólogos. Ahora que hemos tratado la base química del DNA y su replicación, podemos considerar cómo se lleva a cabo la recombinación a nivel molecular. En general, la siguiente información atañe al intercambio genético entre dos moléculas homólogas de DNA de doble cadena, tanto de cromosomas víricos y bacterianos como de homólogos eucarióticos durante la meiosis. El intercambio genético en posiciones equivalentes entre dos cromosomas con una homología substancial en su secuencia se denomina **recombinación generalizada** u **homóloga**.

Hay varios modelos que intentan explicar la recombinación homóloga, y todos comparten algunas características comunes. Primero, todos se basan en las propuestas iniciales que, independientemente, propusieron Robin Holliday y Harold L. K. Whitehouse en 1964. También dependen, para la precisión del intercambio, de la complementariedad entre las cadenas de DNA. Finalmente, cada modelo cuenta con una serie de procesos enzimáticos para llevar a cabo la recombinación genética.

Uno de estos modelos se esquematiza en la Figura 11.18. Empieza con dos dúplex de DNA emparejados u homólogos [Paso (a)], en cada uno de los cuales una endonucleasa introduce un corte[3] en una de las cadenas en posiciones idénticas [Paso (b)]. Los extremos de las cadenas producidos por estos cortes se desplazan y, posteriormente, se emparejan con sus complementarios del dúplex opuesto [Paso (c)]. Una ligasa une los extremos sueltos [Paso (d)], formando dúplex híbridos denominados **moléculas de DNA heterodúplex**. El intercambio forma un punto de intersección. La posición de este punto de intersección puede moverse por el cromosoma en un proceso denominado desplazamiento del punto de intersección [Paso (e)]. Esto ocurre como consecuencia de un efecto de «cremallera» por el que los puentes de hidrógeno se rompen y se vuelven a formar entre bases complementarias de las cadenas separadas de cada dúplex. Este desplazamiento produce un incremento en la longitud de los heterodúplex de DNA en ambos homólogos.

Si los dúplex se separan [Paso (f)], y la parte inferior gira 180° [Paso (g)], se forma una estructura intermedia plana denominada **forma χ**[4], la característica **estructura de Holliday**. Si ahora una endonucleasa corta las dos cadenas de los homólogos que estaban implicados en el intercambio [Paso (h)], y éstas se unen [Paso (i)], se forman dúplex recombinantes. Obsérvese que se altera la disposición de los alelos como consecuencia de la recombinación.

Entre las pruebas a favor del modelo anterior hay imágenes de microscopía electrónica de moléculas planas de tipo c en bacterias en las que cuatro brazos dúplex están unidos en un solo punto de intercambio [Figura 11.18 (Paso g)]. Además, el descubrimiento de la **proteína RecA** en *E. coli* proporciona una prueba importante. Esta molécula fomenta el intercambio de moléculas recíprocas de DNA de cadena sencilla como debe ocurrir en el Paso (c) del modelo. Más aun, RecA intensifica la formación de puentes de hidrógeno durante el desplazamiento de las cadenas, iniciando así la formación del heterodúplex. Finalmente, se han descubierto e investigado otras muchas enzimas imprescindibles para los procesos de corte y unión. Se cree que los productos de los genes *recB*, *recC*, y *recD* participan en el corte y desespirilización del DNA. Se han encontrado numerosas mutaciones que evitan la recombinación genética en virus y bacterias. Estas mutaciones identifican a genes cuyos productos tienen una función imprescindible en este proceso.

11.14 La conversión génica es consecuencia de la recombinación del DNA

Una modificación del modelo anterior nos ha ayudado a entender mejor un fenómeno genético especial conocido como **conversión génica**. Encontrado inicialmente en levaduras por Carl Lindegren y en *Neurospora* por Mary Mitchell, la conversión génica se caracteriza por un intercambio genético *no recíproco* entre dos genes ligados muy próximos. Por ejemplo, si uno fuese a cruzar dos cepas de *Neurospora* llevando cada una de ellas una mutación diferente ($a+ \times +b$), la recombinación recíproca entre los genes produciría parejas de esporas de los genotipos $++$ y *ab*. Sin embargo, un intercambio no recíproco produce sólo un par, sin el otro. Trabajando con mutantes de piridoxina, Mitchell observó diversas ascas que contenían pares

[3] *Nota del traductor:* otros autores (Meselson y Radding) han propuesto que la estructura de Holliday puede originarse sólo con un corte de cadena sencilla de uno de los homólogos, que invadiría el segundo dúplex.

[4] *Nota del traductor:* también se denomina forma ji, por la letra griega que la representa.

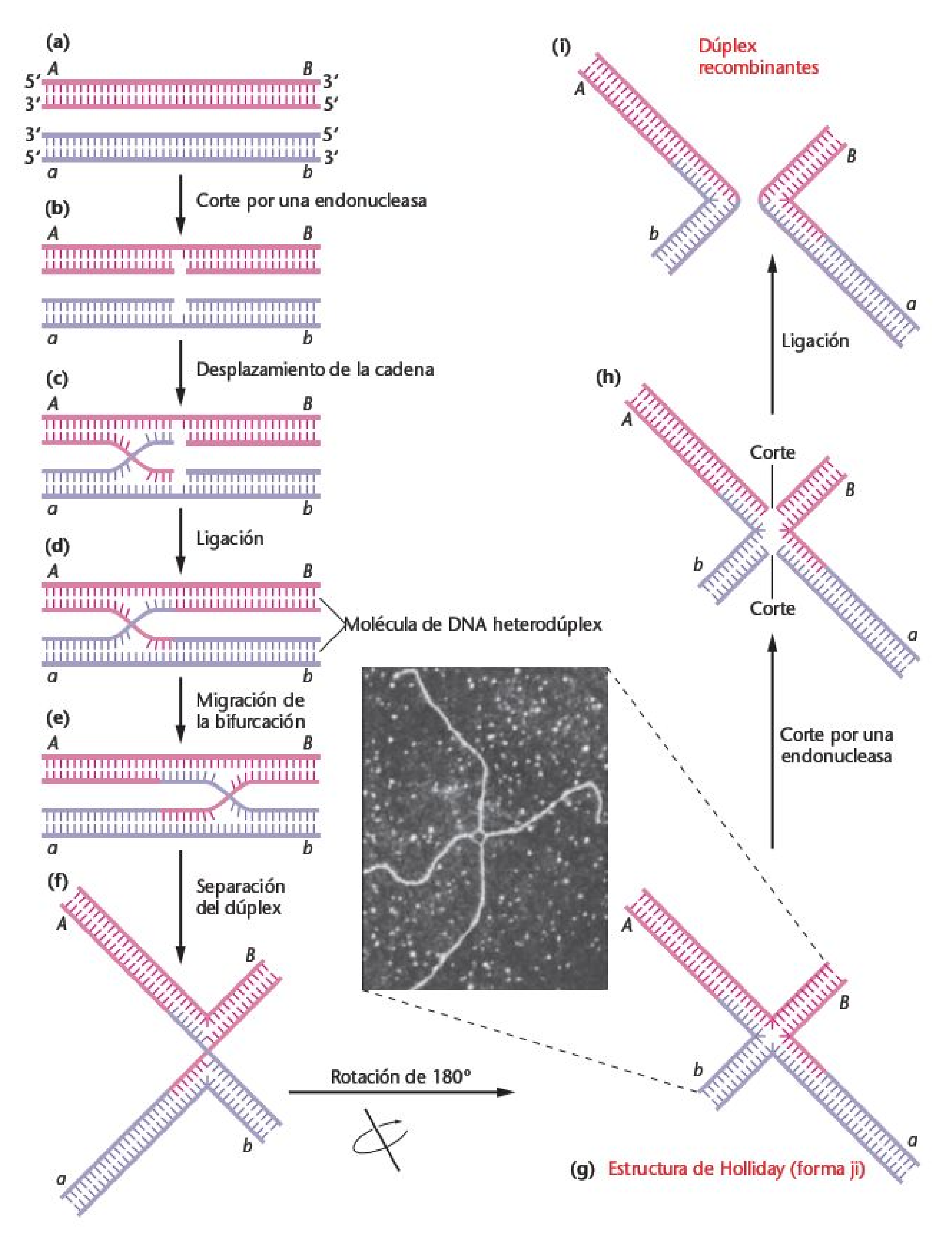


FIGURA 11.18 Modelo que describe cómo se produce la recombinación genética como resultado de la rotura y unión de cadenas heterólogas de DNA. En el texto se describe cada estadio. La micrografía electrónica muestra una estructura χ parecida a la del diagrama (g); el DNA, que muestra una estructura de Holliday estirada, representa un intermediario de recombinación proveniente del plásmido *Col*E1 de *E. coli*. *David Dressler, Oxford University, Inglaterra.*

de esporas con el genotipo ++, pero no con el producto recíproco (*ab*). Debido a que la frecuencia de estos sucesos era más alta que la predicha por la tasa de mutación y que por lo tanto no podía justificarse por este fenómeno, se denominaron *conversiones génicas*. Se llamó así puesto que parecía que, de algún modo, un alelo se había «convertido» en el otro durante un proceso en el que también había ocurrido un intercambio genético. Se hicieron descubrimientos similares al estudiar otros hongos.

Actualmente se considera que la conversión génica es una consecuencia del proceso de recombinación de DNA. Una posi-

ble explicación es interpretar la conversión como un mal emparejamiento de pares de bases durante la formación del heterodúplex en la recombinación genética, como se representa en la Figura 11.19. Las regiones mal emparejadas de las cadenas híbridas se pueden reparar mediante la escisión de una de las cadenas y la síntesis de la complementaria utilizando de molde la cadena que queda. La escisión puede producirse en cualquiera de las dos cadenas, produciendo dos posibles «correcciones». Una repara el par de bases mal emparejado y reestablece la secuencia original. La otra también corrige el desemparejamiento, pero lo hace copiando la cadena alterada, creándose una sustitución de un par de bases. La conversión puede tener el efecto de hacer alelos idénticos en dos homólogos que eran inicialmente diferentes.

En el ejemplo de la Figura 11.19, suponga que el par G≡C de uno de los dos homólogos corresponde al alelo mutante, mientras que el par A=T forma parte de la secuencia génica silvestre del otro homólogo. La conversión del par G≡C en A=T tendría el efecto de cambiar el alelo mutante a salvaje, exactamente como Mitchell observó.

La conversión génica ha ayudado a explicar otros fenómenos genéticos enigmáticos en hongos. Por ejemplo, cuando se estudian los alelos mutante y silvestre de un sólo gen en un cruzamiento, las ascas deberían producir un número igual de esporas silvestres y mutantes. Sin embargo, algunas veces se observan ascas excepcionales con proporciones de 3:1 ó 1:3. Estas proporciones se entienden en términos de conversión génica. Este fenómeno también se ha detectado durante procesos mitóticos en hongos y en el estudio de cromosomas compuestos especiales en *Drosophila*.

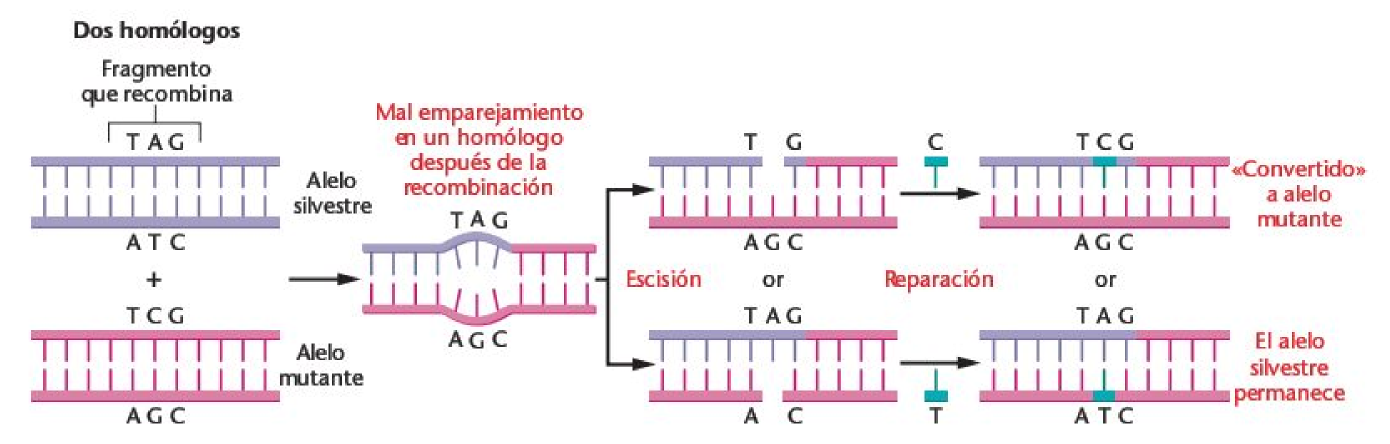


FIGURA 11.19 Esquema del mecanismo propuesto para justificar el fenómeno de la conversión génica. Durante la formación del heterodúplex que acompaña a la recombinación en la meiosis se produce un mal emparejamiento de bases en uno de los dos homólogos (el que lleva el alelo mutante). Durante la reparación por escisión, se elimina uno de los dos emparejamientos erróneos y se sintetiza el complementario. En un caso, se conserva el par de bases mutante. Tras quedar incluido en una espora recombinante, se mantendrá el genotipo mutante. En el otro caso, el par de bases mutante es convertido a la secuencia silvestre. Después de quedar incluido en una espora recombinante, se expresará el genotipo silvestre, dando lugar a una proporción de intercambio no recíproco.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

La telomerasa: ¿la clave de la inmortalidad?

Los humanos, como todos los organismos pluricelulares, envejecen y mueren. Con la edad, el sistema inmunitario se vuelve menos eficiente, la cicatrización de las heridas presenta problemas y los tejidos y órganos pierden flexibilidad. Por qué con la edad perdemos capacidades y por qué cada especie tiene un característico ciclo vital finito ha sido siempre un misterio. ¿Por qué envejecemos? ¿Podemos cambiar el curso de la mortalidad? Algunos descubrimientos recientes sugieren que la respuesta a estas preguntas puede estar en el extremo de los cromosomas.

El estudio del envejecimiento humano empieza con el estudio de células en placas de cultivo. Igual que los organismos de los que se han obtenido dichas células, en cultivo éstas tienen un ciclo vital finito. La senescencia replicativa fue observada por Hayflick hace más de 30 años. Este científico publicó que los fibroblastos humanos normales pierden la capacidad de crecer y de dividirse tras 50 divisiones celulares. Estas células senescentes permanecen metabólicamente activas, pero no pueden

continuar proliferando. Con el paso del tiempo, mueren. Aunque no sabemos si la senescencia celular provoca directamente el envejecimiento de los organismos, las pruebas de que se dispone así lo sugieren. Por ejemplo, las células de gente joven experimentan más divisiones en cultivo que las células de personas mayores; las células de fetos humanos se dividen de 60 a 80 veces antes de convertirse en senescentes, mientras que las células de una persona de edad avanzada sólo se dividen de 10 a 20 veces. Además, las células de especies con un ciclo vital corto dejan de crecer tras menos divisiones que las provenientes de especies con un ciclo vital más largo; las células de ratón se dividen de 11 a 15 veces en cultivo, mientras que las de tortuga experimentan más de 100 divisiones. En este mismo sentido, las células de pacientes con síndromes de envejecimiento prematuro de origen genético (como el síndrome de Werner) experimentan menos divisiones en cultivo que las células de pacientes sin el síndrome.

Otra característica del envejecimiento celular es el acortamiento de sus telómeros. Los *telómeros* son las puntas de los cromosomas lineales, y están formados por cortas secuencias de DNA repetidas miles de veces (en humanos, TTAGGG). Los telómeros ayudan a conservar la integridad estructural de los cromosomas protegiendo sus extremos de la degradación y evitando que se fusionen con otros cromosomas. Los telómeros son generados y mantenidos por la telomerasa, una extraordinaria enzima que contiene RNA que añade secuencias de DNA telomérico a los extremos de los cromosomas lineales. La telomerasa también soluciona el problema de la replicación de los extremos, el que afirma que las moléculas lineales de DNA se acortan en cada replicación porque la DNA polimerasa no puede sintetizar nuevo DNA en los extremos 39 de las cadenas progenitoras. Mediante la adición de numerosas secuencias teloméricas repetidas al extremo 39 de los cromosomas, la telomerasa evita que los cromosomas se encojan hasta caer en el olvido. Desgraciadamente, las células somáticas contienen muy poca o ninguna telomerasa. En consecuencia, la longitud del telómero decrece unos 100 pares de bases cada vez que una célula normal se divide. El acortamiento de los telómeros puede funcionar como un reloj que cuenta las divisiones celulares e indica a la célula que deje de dividirse.

¿Podemos obtener juventud y vitalidad perpetuas si incrementamos la longitud de nuestros telómeros? Un estudio reciente sugiere que es posible invertir el proceso de senescencia incrementando artificialmente la cantidad de telomerasa de nuestras células. Cuando los investigadores introdujeron genes clonados de la telomerasa en células humanas normales en cultivo, los telómeros se alargaron varios miles de pares de bases y las células continuaron creciendo mucho más allá de su punto de senescencia. Estas observaciones confirman que la longitud del telómero funciona de reloj celular. Además, también sugieren que algunas de las atrofias de los tejidos asociadas a la vejez podrían algún día invertirse activando los genes de la telomerasa. Sin embargo, antes que nos apresuremos a comprar pastillas de telomerasa, debemos considerar una posible consecuencia de la inmortalidad celular: el cáncer.

Si bien las células normales experimentan la senescencia tras un cierto número de divisiones celulares, las células cancerosas no lo hacen. Se piensa que el cáncer surge tras la acumulación de diversas mutaciones genéticas en una célula. Estas mutaciones trastornan los puntos normales de control y de mantenimiento del equilibrio que controlan el crecimiento y la división celular. Por tanto parece lógico que las células cancerosas hayan parado el reloj normal del envejecimiento. Si sus telómeros se acortan tras cada división celular, con el tiempo las células tumorales sucumbirían al envejecimiento y dejarían de crecer. Sin embargo, si sintetizasen polimerasa detendrían el avance del reloj de la senescencia y se convertirían en inmortales. De acuerdo con esta idea, más del 90% de las células tumorales humanas tienen actividad de la telomerasa y poseen telómeros estables. La correlación entre el crecimiento tumoral incontrolado y la presencia de actividad de la telomerasa es tan buena que se están desarrollando pruebas de telomerasa como marcadores diagnósticos para el cáncer. Si bien actualmente hay cierto debate sobre si la presencia de telomerasa es un prerrequisito de la transformación celular o una consecuencia de ella, es posible que la adquisición de actividad de la telomerasa sea un paso importante en el desarrollo e las células cancerosas. Esta hipótesis se ve apoyada por estudios recientes que muestran que la inducción de actividad de la telomerasa, cuando se combina con la inactivación de un gen supresor de tumores ($p16^{INK4a}$) produce inmortalización celular, un paso esencial hacia el desarrollo de un tumor. Por tanto, cualquier intento de incrementar la actividad de la telomerasa en células normales acarrearía el riesgo de incrementar el desarrollo de tumores.

Una posibilidad atractiva es que la telomerasa pueda ser una diana ideal para los medicamentos anti-cáncer. Los medicamentos que inhiben la telomerasa podrían destruir las células cancerosas al permitir que sus telómeros se acorten, lo que empujaría a las células hacia la senescencia. Puesto que la mayor parte de células humanas no expresan la telomerasa, una terapia de este tipo podría ser específica para las células tumorales y, en consecuencia, menos tóxica que la mayoría de medicamentos actuales anti-cáncer. Geron Corporation está desarrollando estos medicamentos anti-telomerasa anti-cáncer. Aunque todavía no sabemos si esta aproximación funcionará en animales, parece funcionar en células tumorales en cultivo. Las células tumorales tratadas con un agente anti-telomerasa pierden secuencias teloméricas y mueren tras unas 25 divisiones celulares.

Antes de que estos medicamentos anti-telomerasa puedan ser desarrollados y utilizados en humanos, deben resolverse diversas cuestiones. ¿Precisan telomerasa algunas células humanas normales (como los linfocitos y las células germinales)? Si fuese así, los medicamentos anti-telomarasa podrían ser demasiado tóxicos como para ser aceptados. ¿Pueden algunas células cancerosas compensar la pérdida de la telomerasa utilizando otros mecanismos de alargamiento de los telómeros (como la recombinación)? Si fuese así, los medicamentos anti-telomerasa podrían estar condenados al fracaso. Incluso si inhibimos la actividad de la telomerasa en las células tumorales, ¿podrían experimentar múltiples divisiones antes de llegar a la senescencia y de todas formas dañar al huésped?

¿Nos permitirá la telomerasa detener el cáncer e invertir el camino del envejecimiento? El tiempo lo dirá.

Referencias

Bodnar, A.G., et al. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-52.

deLange, T. 1998. Telomeres and senescence: Ending the debate. *Science* 279:334-35.

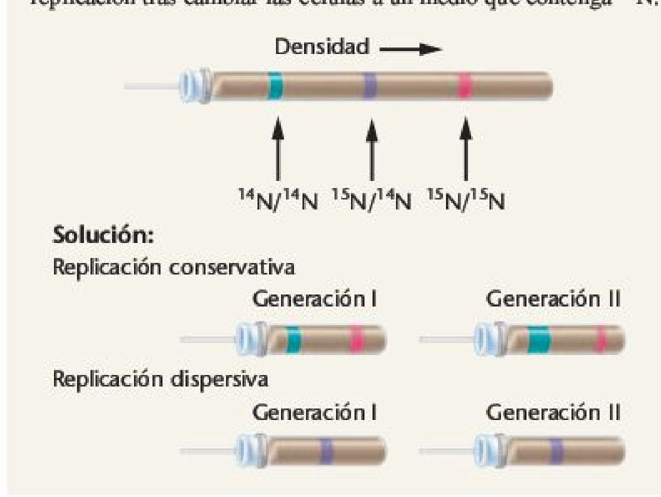
Kiyono, T., et al. 1998. Both RB/$p16^{INK4a}$ inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84-88.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. En teoría, hay tres posibles modelos de replicación del DNA: semiconservativo, conservativo y dispersivo. Aunque los tres se basan en la complementariedad de bases, la replicación semiconservativa es la más directa y fue predicha por Watson y Crick.
2. En 1958, Meselson y Stahl solucionaron este problema a favor de la replicación semiconservativa en *E. coli*, mostrando que el DNA recién sintetizado está formado por una cadena vieja y por una cadena nueva. Taylor, Woods y Hughes utilizaron meristemos radiculares de haba para demostrar la replicación semiconservativa en eucariotas.
3. Durante el mismo periodo, Kornberg aisló DNA polimerasa I de *E. coli* y demostró que es una enzima capaz de sintetizar DNA *in vitro*, siempre que se suministre un molde y nucleósidos trifosfato precursores.
4. El descubrimiento posterior de la cepa mutante *polA1* de *E. coli*, que podía replicar DNA a pesar de carecer de actividad polimerasa I, planteó dudas sobre la función de replicación de esta enzima *in vivo*. Entonces se aislaron las DNA polimerasas II y III. Se ha identificado a la polimerasa III como la enzima responsable de la replicación del DNA *in vivo*.
5. Durante el proceso de síntesis de DNA, la doble hélice se desenrolla y se forma una horquilla de replicación en la que se inicia la síntesis. Hay proteínas que estabilizan la hélice desenrollada y ayudan a relajar la tensión de enrollamiento que se produce por delante de la actividad replicativa.
6. La enzima primasa inicia la síntesis en lugares específicos a lo largo de cada cadena molde, produciendo un corto fragmento de RNA que proporciona un extremo 3' adecuado sobre el que la polimerasa III puede empezar la polimerización.
7. Debido a la característica antiparalela de la doble hélice, la polimerasa III realiza síntesis continua de DNA sobre la cadena líder en dirección 5'-3'. En la cadena opuesta, denominada cadena retrasada, la síntesis produce pequeños fragmentos de Okazaki que son ensamblados más tarde por la DNA ligasa.
8. La DNA polimerasa I elimina el cebador de RNA y lo reemplaza por DNA, y la DNA ligasa lo une al polinucleótido adyacente.
9. El aislamiento de numerosos genes mutantes de fagos y bacterias que afectan a muchas de las moléculas implicadas en la replicación del DNA ha ayudado a definir el complejo control genético de todo el proceso.
10. En eucariotas, la replicación del DNA es similar a la replicación en procariotas, aunque más compleja. Existen múltiples orígenes de replicación y múltiples formas de DNA polimerasa que dirigen la síntesis de DNA.
11. La replicación de los extremos (telómeros) de las moléculas lineales plantea un problema particular en eucariotas que se puede solucionar con una enzima especial que contiene RNA denominada telomerasa.
12. La recombinación homóloga entre moléculas genéticas se basa en un grupo de enzimas que pueden cortar, realinear y unir las cadenas de DNA. El fenómeno de la conversión génica puede explicarse mejor en términos de síntesis reparadora de errores en el emparejamiento durante estos intercambios.

IDEAS Y SOLUCIONES

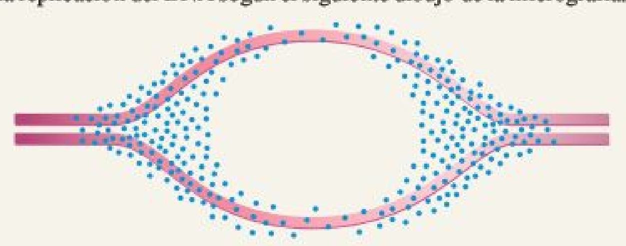
. Prediga los resultados teóricos de los modelos conservativo y dispersivo de síntesis de DNA según las condiciones del experimento de Meselson-Stahl. Utilizando los siguientes patrones de sedimentación, establezca los resultados de dos generaciones de replicación tras cambiar las células a un medio que contenga ^{14}N:



2. Las mutaciones en el gen *dnaA* de *E. coli* son letales y sólo pueden estudiarse si se aíslan mutantes condicionales sensibles al calor. Dichas cepas mutantes crecen y se replican convenientemente a la temperatura permisiva de 18 °C, pero no crecen ni replican su DNA a la temperatura restrictiva de 37 °C. Dos observaciones fueron útiles para determinar la función del producto proteico DnaA. Primero, investigaciones *in vitro* utilizando moldes de DNA que se habían desenrollado no precisan la proteína DnaA. Segundo, si se hacen crecer células intactas a 18 °C y se cambian luego a 37 °C, la síntesis de DNA prosigue hasta que se completa un ciclo de replicación, y luego se detiene. ¿Qué sugieren estas observaciones sobre la función del producto del gen *dnaA*?

Solución: A 18 °C (la temperatura permisiva) no se expresa la mutación y empieza la síntesis de DNA. Después del cambio a la temperatura restrictiva, prosigue la síntesis de DNA que ya se ha iniciado, pero no puede empezar ninguna síntesis nueva. Debido a que no se precisa la proteína DnaA para la síntesis de DNA desenrollado, esta observación sugiere que la proteína actúa *in vivo* durante la iniciación interaccionando con la hélice intacta y facilitando, de algún modo, la desnaturalización localizada necesaria para que proceda la síntesis.

3. Se permite que el DNA se replique en presencia de timidina-^3H moderadamente radioactiva durante varios minutos, y luego se cambia a un medio altamente radioactivo durante varios minutos más. Se para la síntesis, se somete el DNA a una autorradiografía y se observa al microscopio electrónico. Interprete cuanto sea posible de la replicación del DNA según el siguiente dibujo de la micrografía.



Solución: Una interpretación es que hay dos horquillas de replicación avanzando en direcciones opuestas y que, por lo tanto, la replicación es bidireccional. La baja densidad de granos representa la síntesis ocurrida durante los primeros minutos, empezando por el origen y prosiguiendo hacia afuera en ambas direcciones. La densidad más alta de granos representa los últimos minutos de síntesis, en los que se incrementó el nivel de radioactividad.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Compare los modelos conservativo, semiconservativo y dispersivo de replicación del DNA.
2. Describa la función del ^{15}N en el experimento de Meselson-Stahl.
3. En el experimento de Meselson-Stahl, ¿qué modelo de replicación puede descartarse tras un ciclo de replicación? ¿Y tras dos ciclos?
4. Prediga los resultados del experimento de Taylor, Woods y Hughes si la replicación fuese (a) conservativa y (b) dispersiva.
5. Reconsidere el problema 35 del Capítulo 10. En el modelo que propuso, ¿podría haberse replicado la molécula semiconservativamente? ¿Por qué? ¿Podrían funcionar otros modelos de replicación?
6. ¿Cuáles son los requisitos de la síntesis de DNA *in vitro* bajo la dirección de la DNA polimerasa I?
7. En los experimentos iniciales de Kornberg, corrió el rumor que hizo crecer *E. coli* en grandes tanques de cerveza Anheuser-Busch (estaba trabajando en la Washington University de St. Louis). ¿Por qué cree que esto le ayudó en su investigación sobre la polimerasa I?
8. ¿Cómo comprobó Kornberg la fidelidad de copia del DNA por la polimerasa I?
9. ¿Cuál de las pruebas de Kornberg es la más convincente? ¿Por qué?
10. ¿Qué característica de la DNA polimerasa I suscitó la reserva de si su función *in vivo* era la síntesis de DNA que conduce a su completa replicación?
11. Explique la teoría de la frecuencia del vecino más próximo.
12. ¿Qué significa la expresión DNA «biológicamente activo»?
13. ¿Por qué se eligió al fago fX174 para el experimento que demostró la actividad biológica?
14. Resuma el diseño experimental de la demostración de actividad biológica de Kornberg.
15. ¿Cuál fue la importancia de la mutación *polA1*?
16. Resuma y compare las propiedades de las DNA polimerasas I, II y III.
17. Enumere y describa la función de las 10 subunidades que forman la DNA polimerasa III. Distinga entre la holoenzima y el núcleo enzimático.
18. Distinga entre (a) síntesis de DNA unidireccional y bidireccional y (b) síntesis de DNA continua y discontinua.
19. Enumere las proteínas que desenrollan el DNA durante la síntesis de DNA *in vivo*. ¿Cómo funcionan?
20. Defina e indique la importancia de (a) los fragmentos de Okazaki, (b) la DNA ligasa, y (c) el RNA cebador durante la replicación del DNA.
21. Resuma el modelo actual de síntesis de DNA.
22. ¿Por qué se espera que la síntesis de DNA sea más compleja en eucariotas que en bacterias? ¿En qué es similar la síntesis de DNA en estos dos tipos de organismos?
23. Si el análisis del DNA de dos organismos diferentes mostrase una composición de bases muy parecida, el DNA de ambos organismos ¿la secuencia del DNA de ambos organismos también sería casi idéntica?
24. Suponga que *E. coli* sintetiza DNA a una velocidad de 100.000 nucleótidos por minuto y que tarda 40 minutos en replicar su cromosoma.
    (a) ¿Cuántos pares de bases hay en el cromosoma completo de *E. coli*?
    (b) ¿Cuál es la longitud física del cromosoma en su configuración helicoidal, es decir, cuál es la circunferencia del cromosoma si se mantiene en forma de círculo?
25. Diversas cepas mutantes de *E. coli* sensibles al calor manifiestan distintas características. Prediga qué enzima o función se ve afectada por cada mutación.
    (a) El DNA recién sintetizado contiene muchos pares de bases mal emparejadas.
    (b) Se acumulan fragmentos de Okazaki, y no se completa nunca la síntesis de DNA
    (c) No se produce la iniciación

(d) La síntesis es muy lenta

(e) Se encuentran cadenas superenrolladas durante la replicación, que no se completa nunca.

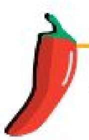
26. Defina conversión génica y describa la relación de este fenómeno con la recombinación genética.

27. Muchos de los productos génicos que participan en la síntesis del DNA se caracterizaron inicialmente investigando cepas mutantes de *E. coli* que no podían sintetizar DNA.

(a) El gen *dnaE* codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III. ¿Qué efecto se espera si hay una mutación en este gen? ¿Cómo se puede mantener la cepa mutante?

(b) El gen *dnaQ* codifica la subunidad ϵ de la DNA polimerasa. ¿Qué efecto se espera si hay una mutación en este gen?

28. En 1994 se descubrió actividad de la telomerasa en células cancerosas humanas en cultivo (*in vitro*). Si bien la telomerasa no se encuentra activa en los tejidos somáticos humanos, este descubrimiento indicó que los humanos tenemos los genes para la proteína y el RNA de la telomerasa. Dado que la activación inadecuada de la telomerasa puede provocar cáncer, ¿por qué cree que se han mantenido en el genoma humano los genes que codifican esta enzima a lo largo de la evolución? ¿Hay algunos tipos celulares en el cuerpo humano en los que la activación de la telomerasa sería ventajosa e incluso necesaria? Explíquelo.



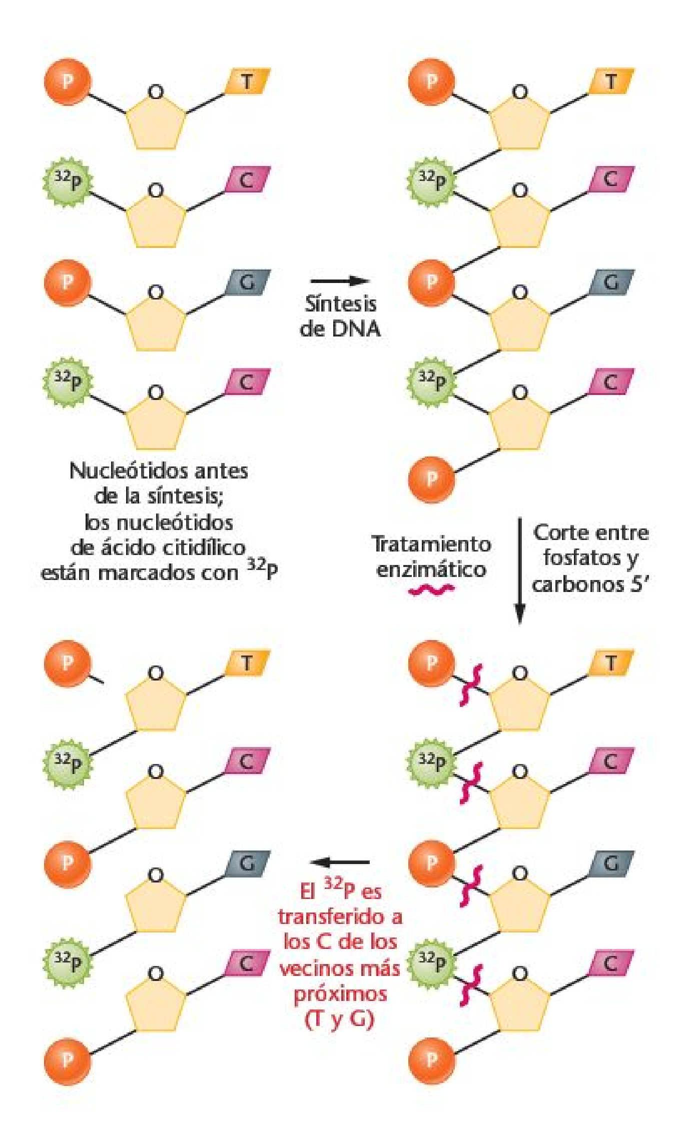
Problemas extra-picantes

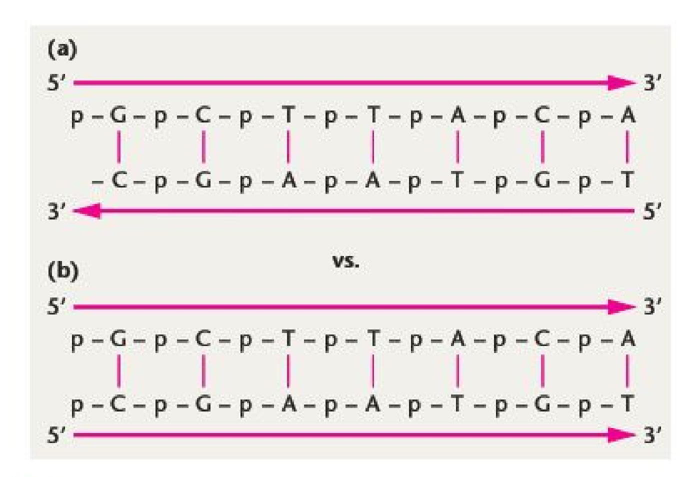
29. El genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tiene aproximadamente $1{,}6 \times 10^8$ pares de bases. La síntesis de DNA se produce a una velocidad de 30 bases por segundo. En el embrión temprano, todo el genoma se replica en cinco minutos. ¿Cuántos *orígenes de síntesis bidireccional* se precisan para cumplir esta hazaña?

30. Para probar la fidelidad de la copia, Kornberg y sus colaboradores utilizaron la prueba de la frecuencia del vecino más próximo, que determina la frecuencia con la que dos bases cualesquiera se presentan adyacentes a lo largo de la cadena polinucleotídica (*J. Biol. Chem*. 236:864-75). Este ensayo se basa en la enzima fosfodiesterasa de bazo. Como se vio en la Figura 11.8 durante la síntesis de DNA se insertan los nucleótidos 5′; es decir, cada nucleótido se añade con el fosfato en el C-5′ de la desoxirribosa. Sin embargo, como se muestra en la siguiente figura, la enzima fosfodiesterasa corta entre el fosfato y el átomo C-5′, produciendo por lo tanto nucleótidos 3′. Durante la síntesis de DNA se usa uno de los cuatro nucleótidos con el fosfato marcado radiactivamente con ^{32}P de (por ejemplo, el del ácido citidílico). Después del corte enzimático, el fosfato radioactivo se transferirá a la base «vecina más próxima» del lado 5′ de todos los nucleótidos de ácido citidílico.

Después de cuatro experimentos distintos, en los que en cada caso sólo uno de los cuatro tipos de nucleótidos es radioactivo, se puede calcular la frecuencia de todos los 16 vecinos más próximos posibles. Cuando Kornberg aplicó la prueba de la frecuencia del vecino más próximo a moldes de DNA y a su producto resultante en diversos experimentos, encontró concordancia entre la frecuencia del vecino más próximo de ambos.

El análisis de los datos del vecino más próximo indujo a Kornberg a concluir que las dos cadenas de la doble hélice tienen polaridad opuesta. Demuestre esta aproximación determinando el resultado de dicho análisis si las cadenas de las siguientes moléculas son (a) antiparalelas *versus* (b) paralelas:





31. Suponga un organismo hipotético en el que la replicación del DNA es conservativa. Diseñe un experimento similar al de Taylor, Woods y Hughes que lo demuestre de manera inequívoca. Utilizando el formato de la Figura 11.5, dibuje cromátidas hermanas y esquematice los resultados esperados dado este tipo de replicación.

32. La DNA polimerasa de todos los organismos sólo añade nucleótidos 5′ al extremo 3′ de la cadena de DNA en crecimiento, nunca al extremo 5′. Un posible motivo es el hecho de que la mayor parte de las polimerasas tienen la función de corrección de pruebas, la cual no sería *energéticamente* posible si la síntesis del DNA se produjese en dirección 3′-5′.

(a) Dibuje la reacción que la DNA polimerasa debería catalizar si la síntesis del DNA se produjese en dirección 3′-5′.

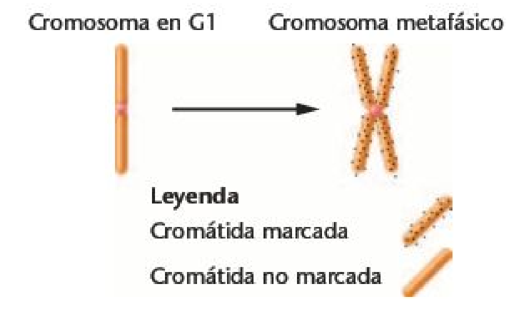
(b) Considerando la información de su esquema, especule por qué la corrección de pruebas sería problemática, mientras que si la síntesis se produce en dirección 5′-3′ no lo es.

33. Se investiga un organismo alienígena que muestra características eucarióticas. Cuando se examina la replicación de su DNA se hacen evidentes dos características especiales: (1) no se observan fragmentos de Okazaki; y (2) tiene un problema con los telómeros, que se acortan, pero sólo por un extremo del cromosoma. Proponga un modelo de DNA que sea congruente con ambas observaciones.

34. Suponga que la secuencia de bases que se muestra a continuación está presente en una cadena nucleotídica de un DNA dúplex y que la cadena está abierta en una horquilla de replicación. Se produce la síntesis de un cebador de RNA sobre este molde, empezando en la base subrayada. (a) Si el cebador de RNA está formado por 8 nucleótidos, ¿cuál es su secuencia de bases? (b) En el cebador de RNA intacto, ¿qué nucleótido tiene un extremo 3′-OH libre?

3′.....GGCTACC<u>T</u>GGATTCA.....5′

35. Considere el siguiente esquema. Suponga que el cromosoma en fase G1 de la izquierda experimenta un ciclo de replicación en presencia de ^{3}H-timidina, y que el cromosoma metafásico de la derecha tiene ambas cadenas marcadas. ¿Qué modelo de replicación (conservativo, dispersivo, semiconservativo) podría eliminarse con esta observación?



LECTURAS SELECCIONADAS

Blackburn, E.H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-72.

Davidson, J.N. 1976. *The biochemistry of nucleic acids*, 8th ed. Orlando, FL: Academic Press.

DeLucia, P., and Cairns, J. 1969. Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature* 224:1164-66.

Gilbert, D.M. 2001. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294:96-100.

Greider, C.W. 1996. Telomeres, telomerase, and cancer. *Sci. Am.* (Feb.) 274:92-97.

______. 1998. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:90-92.

Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5:282-304.

Holmes, F.L. 2001. *Meselson, Stahl, and replication of DNA: A history of the "most beautiful experiment in biology."* New Haven: Yale U. Press.

Kim, J., Kaminker, P. and Campisi, J. 2002. Telomeres, aging and cancer. In search of a happy ending. *Oncogene* 21:503-11.

Kornberg, A. 1960. Biological synthesis of DNA. *Science* 131: 1503-8.

______. 1974. *DNA synthesis*. New York: W.H. Freeman.

Kornberg, A., and Baker, T. 1992. *DNA replication*, 2d ed. New York: W.H. Freeman.

Meselson, M., and Stahl, F.W. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 44:671-82.

Mitchell, M.B. 1955. Aberrant recombination of pyridoxine mutants of *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 41:215-20.

Okazaki, T., et al. 1979. Structure and metabolism of the RNA primer in the discontinuous replication of prokaryotic DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:203-22.

Radman, M., and Wagner, R. 1988. The high fidelity of DNA duplication. *Sci. Am.* (Aug.) 259:40-46.

______. 1987. Genetic recombination. *Sci. Am.* (Feb.) 256:90-101.

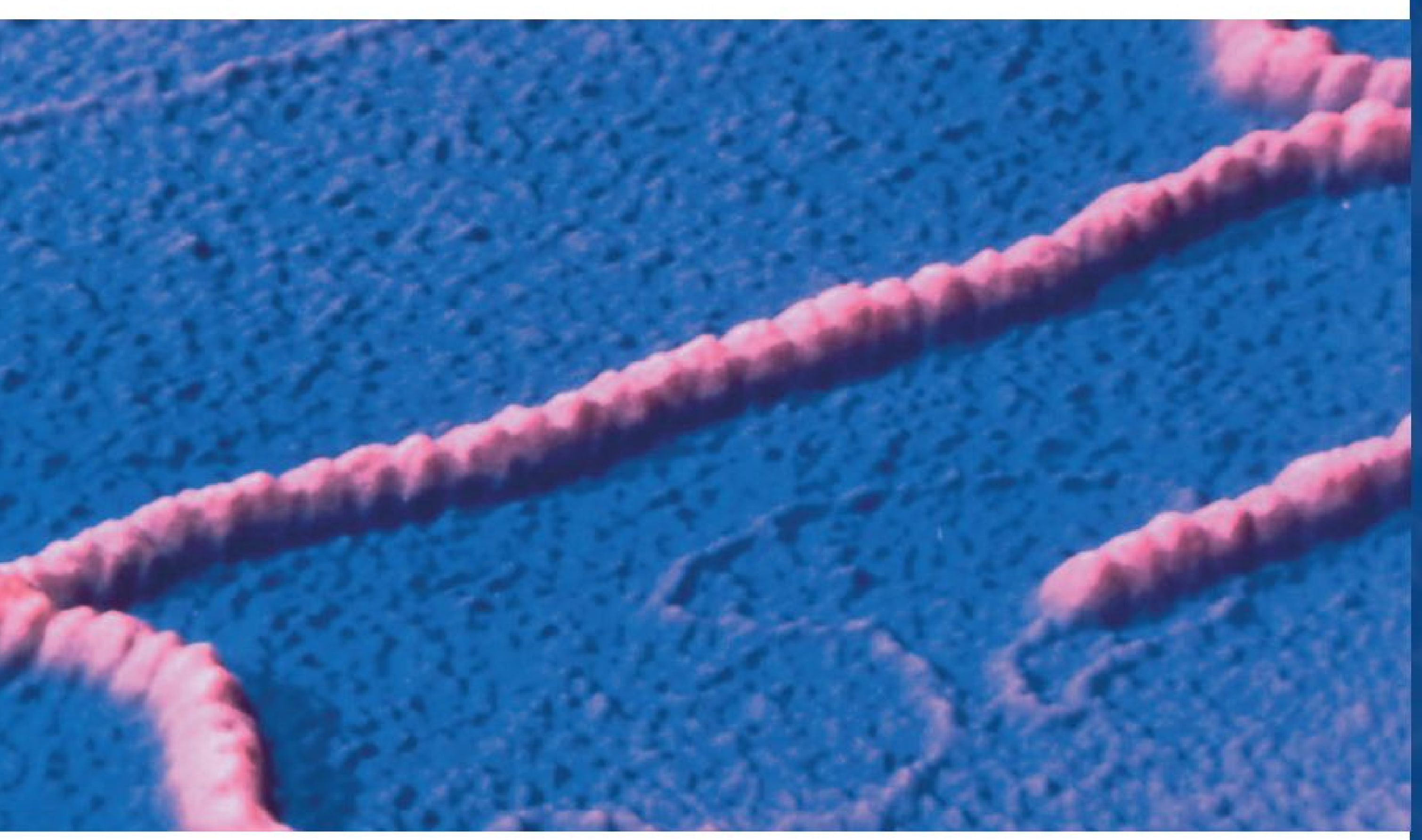
Taylor, J.H., Woods, P.S., and Hughes, W.C. 1957. The organization and duplication of chromosomes revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 48:122-28.

Wang, J.C. 1982. DNA topoisomerases. *Sci. Am.* (July) 247:94-108.

______. 1987. Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta* 909:1-9.

Whitehouse, H.L.K. 1982. *Genetic recombination: Understanding the mechanisms*. New York: Wiley.

La organización del DNA en cromosomas



Fibra de cromatina vista utilizando el microscopio electrónico de rastreo de transmisión (STEM).

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La información genética en los virus, las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos está contenida en la mayor parte de los casos en una molécula de DNA corta, circular y relativamente libre de proteínas asociadas.
- Las células eucarióticas contienen cantidades relativamente grandes de DNA, que se encuentra organizado en nucleosomas y se presenta en forma de fibras de cromatina durante la mayor parte del ciclo celular.
- Durante los estadios de división, las fibras de cromatina se enrollan en cromosomas.
- Los genomas eucarióticos se caracterizan por la presencia de secuencias de DNA únicas y de secuencias de DNA repetitivas.
- La mayor parte de los genomas eucarióticos está formado por secuencias de DNA no codificante, algunas de las cuales interrumpen las regiones codificantes de los genes.

Una vez se comprendió que el DNA alberga la información genética, fue muy importante determinar cómo el DNA se organiza en genes y cómo estas unidades básicas de la función genética se organizan en cromosomas. En resumen, la pregunta más importante era cómo se organiza el material genético para formar el genoma de los organismos. Ha habido mucho interés en esta cuestión ya que conocer la organización del material genético y de las moléculas asociadas es importante para la comprensión de muchas otras áreas de la genética. Por ejemplo: cómo se almacena la información genética, cómo se expresa y cómo se regula, debe estar relacionado con la organización molecular de la molécula genética, el DNA. Cómo varía la organización genómica en diferentes organismos —desde virus y bacterias hasta eucariotas— proporcionará, sin duda, una mejor comprensión de la evolución de los organismos en la Tierra.

En este capítulo nos centraremos en las diversas maneras que tiene el DNA de organizarse en cromosomas. El material genético se ha estudiado utilizando numerosas aproximaciones, incluyendo la microscopia óptica y la electrónica. Más recientemente, el análisis molecular ha proporcionado datos importantes de la organización de los cromosomas. Primero veremos qué se sabe de la organización de los cromosomas en virus y en bacterias. Después examinaremos las grandes estructuras especializadas denominadas cromosomas politénicos y cromosomas plumulados. En la segunda mitad del capítulo discutiremos algunas de las cuestiones básicas de la organización genómica en los eucariotas. Por ejemplo, ¿cómo se acompleja el DNA a las proteínas para formar la cromatina, y cómo las fibras de cromatina características de la interfase se condensan en las estructuras cromosómicas visibles durante la mitosis y la meiosis?

Terminaremos el capítulo examinando algunos aspectos de la organización de la secuencia del DNA característica de los genomas eucarióticos. En el Capítulo 20 volveremos a discutir los emocionantes estudios que han clarificado cómo los genes se organizan en cromosomas.

12.1 Los cromosomas víricos y bacterianos son moléculas de DNA relativamente sencillas

Comparados con los cromosomas eucarióticos, los cromosomas de los virus y de las bacterias son mucho menos complicados. Normalmente consisten en una única molécula de ácido nucleico, desprovista en general de proteínas asociadas y que contiene mucha menos información genética que en los múltiples cromosomas que forman el genoma de los eucariotas. Estas características han simplificado enormemente el análisis, proporcionando una idea bastante clara de la estructura de los cromosomas víricos y bacterianos.

El cromosoma de los virus está formado por una molécula de ácido nucleico —DNA o RNA— que puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. Pueden ser estructuras circulares (lazos cerrados covalentemente) o pueden tener la forma de moléculas lineales. El DNA de cadena sencilla del **bacteriófago ϕX174** y el DNA de doble cadena del **virus del polioma** son moléculas circulares alojadas dentro de la cubierta proteica del virus maduro. En cambio, el **bacteriófago lambda (λ)** posee, antes de la infección, una molécula de DNA de doble cadena lineal, que se cierra formando un círculo tras infectar la célula huésped. Otros virus, como los **bacteriófagos T-par**, tienen cromosomas de DNA lineales de doble cadena que no forman círculos dentro de la bacteria huésped. Así, el ser circulares no es un requisito imprescindible para la replicación de algunos virus.

Las moléculas de ácido nucleico de los virus se han visualizado con el microscopio electrónico. La Figura 12.1 muestra un bacteriófago lambda maduro con su molécula de DNA de doble

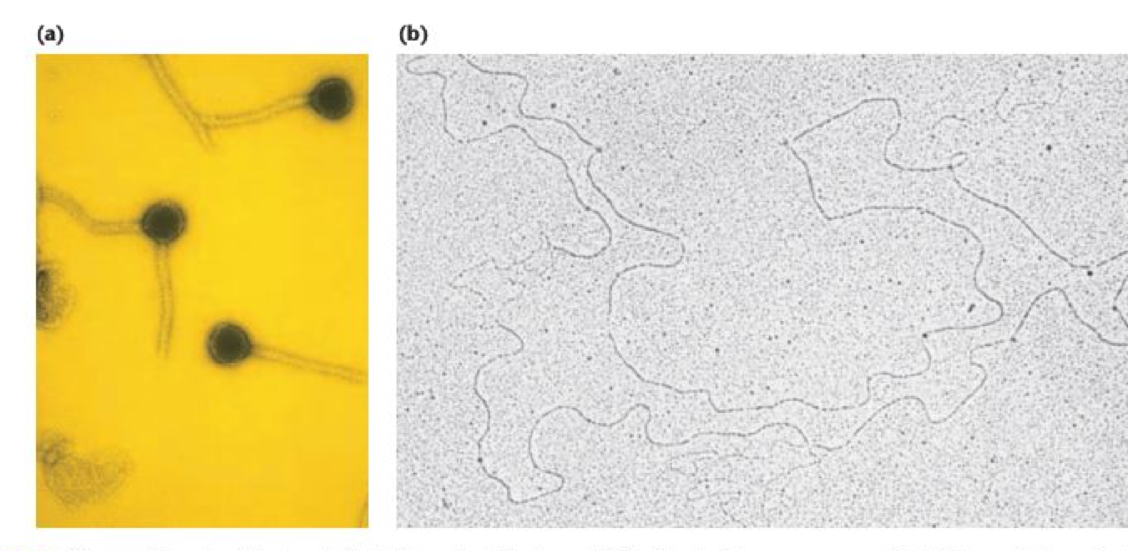


FIGURA 12.1 Micrografías electrónicas (a) del fago λ y (b) de su DNA aislado. El cromosoma mide 17 μm de longitud. Los fagos se han aumentado cinco veces más que el DNA.

TABLA 12.1 **MATERIAL GENÉTICO DE ALGUNOS VIRUS Y BACTERIAS REPRESENTATIVOS**

		Ácido nucleico			
	Organismo	Tipo	CS o DC*	Longitud (μm)	Tamaño global de la cápside vírica o de la bacteria (μm)
Virus	ϕX174	DNA	SS	2,0	0,025 × 0,025
	Virus del mosaico del tabaco	RNA	SS	3,3	0,30 × 0,02
	fago lambda	DNA	DS	17,0	0,07 × 0,07
	fago T2	DNA	DS	52,0	0,07 × 0,10
Bacterias	*Hemophilus influenzae*	DNA	DS	832,0	1,00 × 0,30
	Escherichia coli	DNA	DS	1200,0	2,00 × 0,50

*CS = cadena sencilla; DC = doble cadena

cadena en la configuración circular. Una característica constante compartida por los virus, las bacterias, y las células eucarióticas es la capacidad de empaquetar una molécula de DNA extremadamente larga en un volumen relativamente pequeño. En el fago λ, el DNA tiene 7 μm de longitud y debe encajar en la cápside del fago, cuyos lados tienen menos de 0,1 μm.

La Tabla 12.1 compara la longitud de los cromosomas de varios virus con el tamaño de su cápside. En todos ellos debe llevarse a cabo una proeza de empaquetamiento. Las dimensiones dadas para el fago T2 pueden compararse con la micrografía de su DNA y la de su partícula vírica que se muestra en la Figura 12.2. Rara vez el espacio disponible en la cápside del virus es el doble que el volumen del cromosoma. En muchos casos se llena casi todo el espacio, lo que indica que el empaquetamiento es casi perfecto. Una vez empaquetado dentro de la cápside, el material genético es funcionalmente inerte hasta que se libera en una célula huésped.

Los cromosomas bacterianos también tienen una forma relativamente simple. Siempre están formados por una molécula de DNA de doble cadena, compactada en una estructura que a veces se denomina **nucleoide**. *Escherichia coli*, la bacteria más extensamente estudiada, tiene un cromosoma circular grande que mide aproximadamente 1.200 μm (1,2 μm) de longitud. Cuando la célula se lisa suavemente y el cromosoma se libera, éste puede visualizarse con el microscopio electrónico (Figura 12.3).

El DNA de los cromosomas bacterianos está asociado a varios tipos de **proteínas de unión al DNA**. Dos de estas proteínas, denominadas **HU** y **H**, se caracterizan por ser pequeñas pero abundantes en la célula, y por contener un alto porcentaje de aminoácidos cargados positivamente que pueden unirse iónicamente a las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA[1]. Como veremos pronto, estas proteínas se parecen estructuralmente a las moléculas denominadas **histonas**, que se encuentran asociadas al DNA eucariótico. (Trataremos la organización de las histonas más adelante en este mismo capítulo.) A diferencia del cromosoma vírico fuertemente empa-



FIGURA 12.2 Micrografía elecrónica del bacteriófago T2, con su DNA liberado mediante un choque osmótico. El cromosoma tiene una lonitud de 52 μm.

[1] *Nota del traductor:* se ha propuesto un modelo por el que estas proteínas organizarían el cromosoma en dominios. Cada dominio podría consistir en un lazo de unas 40 kb de DNA negativamente superenrollado (véase a continuación la explicación del DNA superenrollado).

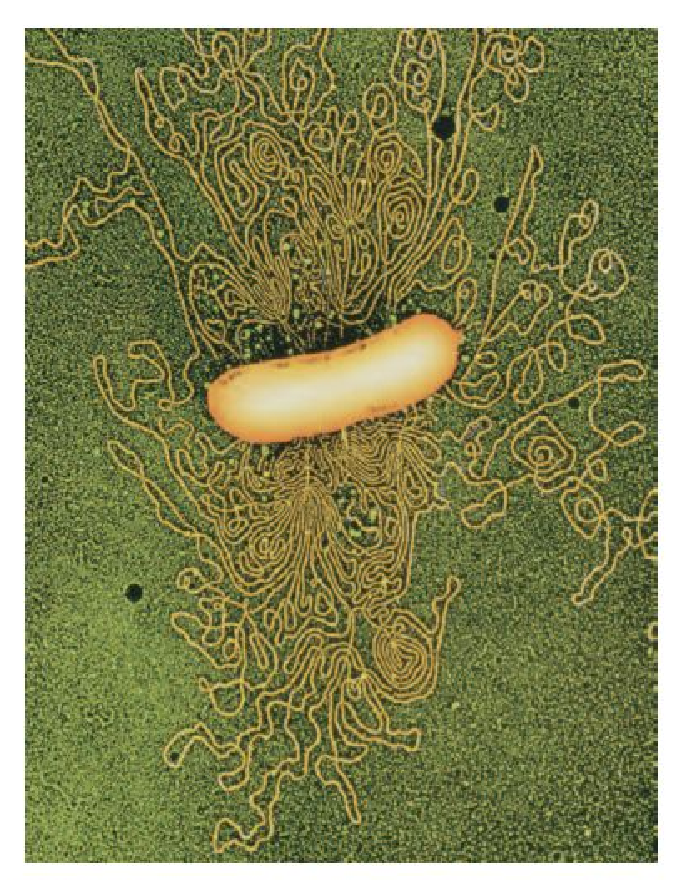


FIGURA 12.3 Micrografía electrónica de la bacteria *Escherichia coli*, con su DNA liberado mediante un choque osmótico. El cromosoma mide 1.200 μm.

quetado en la cápside del virus, el cromosoma bacteriano no es funcionalmente inerte. A pesar de la condición un tanto compactada del cromosoma bacteriano, la replicación y la transcripción se producen con facilidad.

Ahora resuelva esto

El Problema 12.2 de la página 348 considera los cromosomas víricos que son lineales en el cromosoma pero que se circularizan tras entrar en la célula huésped bacteriana.

Sugerencia: Recuerde del Capítulo 11 que los cromosomas lineales se encaran al «problema de los telómeros» durante su replicación.

12.2 Los superenrollamientos son comunes en el DNA de los cromosomas víricos y bacterianos

Una idea importante de como se organiza y se empaqueta el DNA proviene del descubrimiento del **DNA superenrollado**, especialmente característico de las moléculas circulares cerradas. El DNA superenrollado se propuso inicialmente como resultado de una investigación de moléculas de DNA de doble cadena provenientes del virus del polioma, que causa tumores en ratón. En 1963, se observó que cuando este DNA se sometía a ultracentrifugación, se separaba en tres componentes diferentes, cada uno con una diferente densidad y compactación. El menos compacto, y por lo tanto menos denso, tenía una velocidad de sedimentación menor; las otras dos fracciones mostraban velocidades mayores debido a su mayor compactación y densidad. El peso molecular de las tres era idéntico.

En 1965, Jerome Vinograd propuso una explicación para las observaciones anteriores. Postuló que las dos fracciones de mayor velocidad de sedimentación eran moléculas de DNA de polioma circulares, mientras que la fracción de menor velocidad de sedimentación contenía moléculas de DNA de polioma lineales. Las moléculas circulares cerradas son más compactas, y sedimentan más rápidamente que moléculas lineares de la misma longitud y peso molecular.

Vinograd propuso además que la fracción más densa de las dos moléculas circulares consistía en hélices de DNA cerradas covalentemente cuya doble hélice estaba ligeramente *menos enrollada* comparada con las moléculas circulares menos densas. Las fuerzas energéticas que estabilizan la doble hélice se resisten a este menor enrollamiento, lo que provoca un **superenrollamiento** para mantener el emparejamiento de bases normal. Vinograd propuso que la forma superenrollada es la que provoca un empaquetamiento más compacto, lo que incrementa la velocidad de sedimentación.

Las transiciones descritas anteriormente pueden visualizarse en la Figura 12.4. Considere una molécula linear de doble cadena que sea una hélice dextrógira normal de Watson-Crick [Figura 12.4(a)]. Esta hélice contiene 20 giros completos, que definen el **número de unión** de esta molécula ($L = 20$). Si se sellan los extremos de esta molécula se forma un círculo cerrado que está *energéticamente relajado* [Figura 12.4(b)]. Suponga, sin embargo, que se corta el círculo, se desenrollan unas cuantas vueltas completas de la hélice, y se vuelven a sellar sus extremos [Figura 12.4(c)]. Esta estructura, en la que L es igual a 18, está *energéticamente forzada*, y en consecuencia sólo existirá temporalmente en esta forma.

Para asumir una conformación energéticamente más favorable, la molécula puede formar superenrollamientos en dirección opuesta a la de la hélice desenrollada. En nuestro ejemplo [Figura 12.4(d)] se introducen espontáneamente dos superenrollamientos negativos, lo que restablece el número total de vueltas de la hélice original. El término «negativo» hace referencia al hecho de que, por definición, los superenrollamientos son levógiros. El resultado final es la formación de una estructura más compacta con una mayor estabilidad física.

En la mayoría de moléculas de DNA circular de las bacterias y de sus fagos, el DNA está ligeramente desenrollado [como en la Figura 12.4(c)]. Por ejemplo, el virus SV40 contiene 5.200 pares de bases. Si el DNA está relajado, cada vuelta

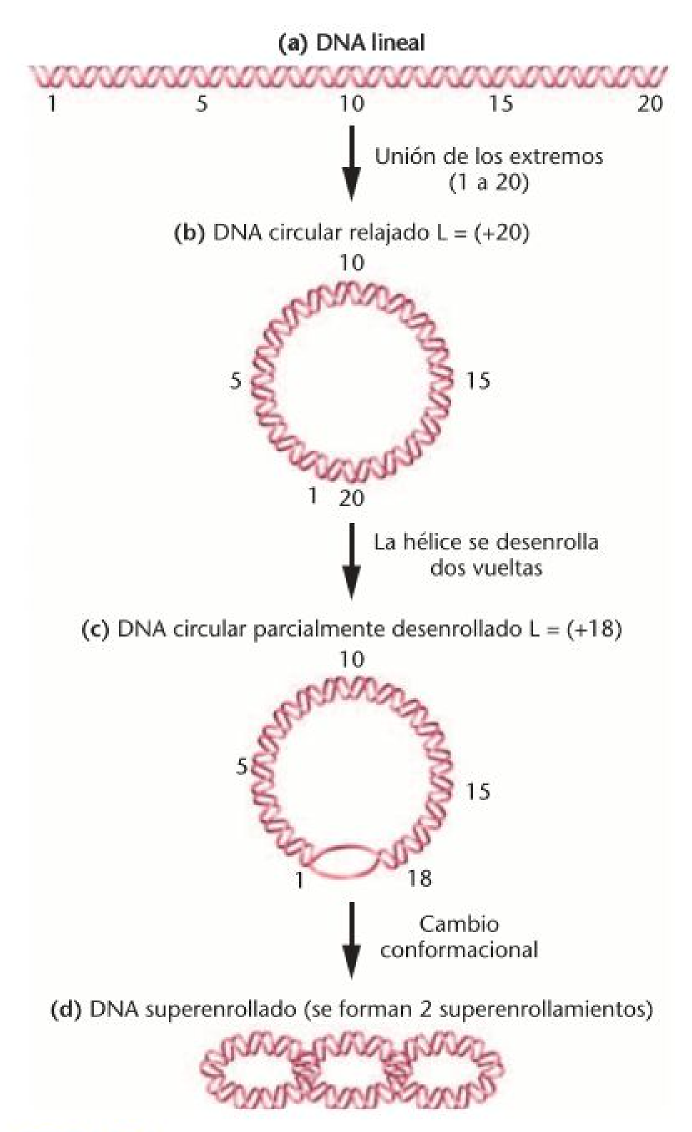


FIGURA 12.4 Esquema de las transformaciones que conducen al superenrollamiento del DNA circular. *L* es el número de unión.

completa de la hélice está ocupada por 10,4 pares de bases, y su número de unión puede calcularse como

$$L = \frac{5.200}{10,4} = 500$$

Cuando se analiza el DNA circular de SV40, éste está desenrollado 25 vueltas, por lo que *L* es igual a 475. Como puede predecirse, se observa la presencia de 25 superenrollamientos negativos. En *E. coli* se observa un número incluso mayor de superenrollamientos, lo que facilita enormemente la condensación del cromosoma en la región del nucleoide.

Cuando dos moléculas idénticas tienen un número de unión diferente, se dice que son **topoisómeros**. Pero, ¿cómo puede una molécula que no tiene extremos libres pasar de un topoisómero a otro, como es el caso de los círculos cerrados de DNA? Biológicamente esto puede lograrse con cualquier enzima de un grupo de enzimas que corta una o ambas cadenas y enrolla o desenrolla la hélice antes de sellar otra vez los extremos.

Estas enzimas se denominan apropiadamente **topoisomerasas**. Descubiertas inicialmente por Martin Gellert y James Wang, estas moléculas catalíticas pueden ser de tipo I o de tipo II, en función de si cortan una o ambas cadenas de la hélice, respectivamente. En *E. coli*, la topoisomerasa I sirve para reducir el número de superenrollamientos negativos de una molécula de DNA circular. La topoisomerasa II introduce superenrollamientos negativos en el DNA. Se cree que esta enzima se une al DNA, lo enrosca, corta las dos cadenas, y luego las pasa por el «lazo» que ha creado. Cuando se restablecen los enlaces fosfodiéster, el número de unión ha disminuido, por lo que se forman espontáneamente uno o más superenrollamientos.

En eucariotas también se encuentra DNA superenrollado y topoisomerasas. Aunque en general los cromosomas de estos organismos no son circulares, pueden hacerse superenrollamientos cuando zonas del DNA están incrustadas en una trama de proteínas asociadas a las fibras de cromatina. Esta asociación forma extremos «fijados» que proporcionan la estabilidad para el mantenimiento de los superenrollamientos una vez las topoisomerasas los han introducido. Como en los procariotas, en eucariotas la replicación y la transcripción del DNA generan superenrollamientos corriente abajo, al desenrollarse la doble hélice para ser accesible a la enzima adecuada.

Estas enzimas podrían también desempeñar otras funciones genéticas implicadas en cambios conformacionales del DNA. Es interesante destacar que las topoisomerasa están implicadas en separar el DNA de las cromátidas hermanas después de la replicación.

12.3 Los cromosomas especializados muestran variaciones de estructura

Vamos a considerar ahora los cromosomas presentes en eucariotas. Antes de tratarlos a nivel molecular, introduciremos primero dos casos de cromosomas altamente especializados. Ambos tipos, los cromosomas politénicos y los cromosomas en escobilla, son tan grandes que su organización fue visualizada utilizando microscopia óptica mucho antes que se comprendiese que el DNA es el material genético. El estudio de estos cromosomas proporcionó muchas de las ideas iniciales sobre la ordenación y la función de la información genética.

Los cromosomas politénicos

Los tejidos de diversos organismos tienen **cromosomas politénicos** gigantes, como en las larvas de algunas moscas (glándulas salivales, tubo digestivo, recto y túbulos excretores de Malpighi) y en algunas especies de protozoos y de vegetales. Tales estructuras las observó por primera vez E. G. Balbiani en 1881. La gran cantidad de información que se ha

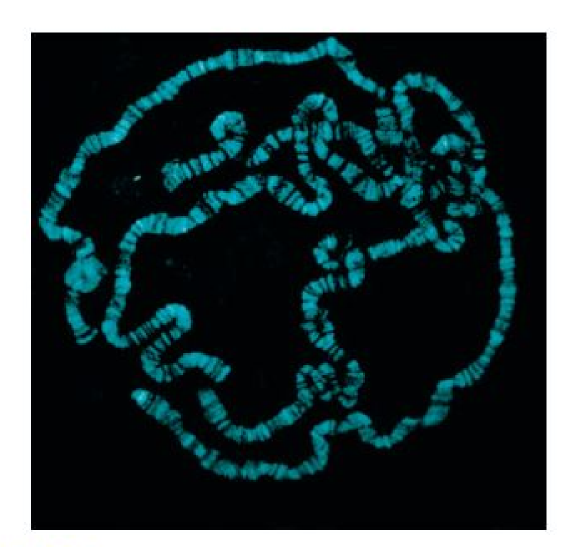


FIGURA 12.5 Cromosoma politénico de célula de glándula salivar de larva de *Drosophila*.

obtenido del estudio de estas estructuras ha proporcionado un sistema modelo para investigaciones más recientes sobre los cromosomas. Lo que es particularmente intrigante de estos cromosomas es que pueden verse en el núcleo de células en interfase.

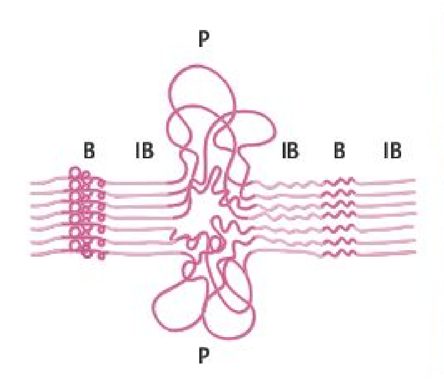
Cuando se observa un cromosoma politénico con el microscopio óptico se advierte una serie lineal de bandas e interbandas alternantes (Figura 12.5). La disposición de las bandas es específica para cada cromosoma de una especie dada. Cada una de las bandas se denomina a veces **cromómero**, un término más general para describir las condensaciones laterales de material a lo largo del eje de un cromosoma. Un cromosoma politénico tiene una longitud entre 200 y 600 μm.

Después de amplios estudios utilizando microscopía electrónica y trazadores radioactivos, queda claro el porqué de la insólita apariencia de estos cromosomas. Primero, los cromosomas politénicos representan a los homólogos apareados. Esto es muy raro ya que se encuentran en células somáticas, dónde, en la mayoría de los organismos, el material cromosómico se encuentra generalmente disperso como cromatina y los homólogos no están apareados. Segundo, su gran tamaño y su apariencia concreta se debe a qué está compuesto por muchas cadenas de DNA. El DNA de estos homólogos apareados sufre diversas rondas de replicación, pero sin que las cadenas se separen y sin que haya división del citoplasma. A medida que prosigue la replicación, se forman cromosomas que tienen de 1.000 a 5.000 cadenas de DNA en paralelo (perfectamente alineadas). Según parece, la disposición en paralelo de tantas cadenas de DNA es lo que da lugar a la especial disposición en bandas a lo largo del eje del cromosoma.

La relación entre la estructura de estos cromosomas y los genes que contienen es intrigante. La presencia de bandas se interpretó al principio como la manifestación visible de genes concretos. Esta interpretación se vio reforzada cuando se comprobó que las cadenas presentes en las bandas sufren una desespiralización localizada cuando los genes son activos. Cada fenómeno de desespiralización da lugar a lo que se denomina un *puff*[2] debido a su apariencia (Figura 12.6). Que los *puffs* son manifestaciones visibles de actividad génica (de transcripción que da lugar a RNA) se demuestra por el alto ritmo de incorporación de precursores radioactivos del RNA, tal como se comprueba por autorradiografía. Las bandas que no se hinchan formando *puffs* no incorporan precursores radioactivos o lo hacen débilmente.

El estudio de las bandas durante el desarrollo de insectos como Drosophila o el mosquito *Chironomus* revela la actividad génica diferencial. A medida que el desarrollo progresa se observa un patrón de *puffs* característico que se relaciona con la actividad génica. A pesar de las muchas investigaciones que se han llevado a cabo, no está claro todavía cuántos genes hay en cada banda. Se sabe que una banda puede contener hasta 10^7 pares de bases de DNA, lo que representa suficiente DNA para codificar entre 50 y 100 genes de tamaño medio.

[2] *Nota del traductor:* el término puff puede traducirse al castellano como borla, ensanchamiento, hinchazón, bullón, etc., aunque tradicionalmente los genéticos siguen utilizando el término inglés.



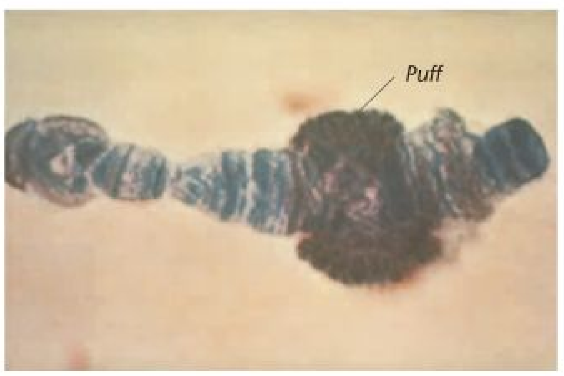


FIGURA 12.6 Fotografía de un *puff* de un cromosoma politénico. El esquema muestra la desespiralización de las cadenas de la región de la banda (B) para producir un *puff* (P) en el cromosoma politénico. También se muestran las regiones entre bandas (IB).

Ahora resuelva esto

El Problema 12.4 de la página 348 trata de cromosomas politénicos cultivados en presencia de timidina ^{3}H y sometidos a autoradiografía.

Sugerencia: La timidina ^{3}H sólo se incorporará durante la síntesis de DNA.

Los cromosomas en escobilla

Otro tipo de cromosomas especiales, que han proporcionado ideas sobre la estructura de los cromosomas, son los **cromosomas en escobilla**. Se les dio este nombre debido a que su apariencia es similar a los cepillos que se utilizaban para limpiar los tiros de las chimeneas en el siglo XIX. Los cromosomas en escobilla se descubrieron en 1892 en oocitos de tiburones y actualmente se sabe que son característicos de muchos vertebrados, así como de espermatocitos de algunos insectos. Por lo tanto son cromosomas meióticos. Gran parte del trabajo experimental se ha llevado a cabo en oocitos de anfibios.

Estos cromosomas especiales se pueden aislar fácilmente en oocitos en la subfase diploteno de la primera profase meiótica, cuando actúan dirigiendo la actividad metabólica de las células en desarrollo. Se observa a los homólogos formando parejas en sinapsis, pero en lugar de estar condensados como ocurre en la mayoría de los cromosomas meióticos, los cromosomas en escobilla tienen a menudo tamaños entre 500 y 800 μm. Más tarde, en la meiosis, revierten a su longitud normal de 15 a 20 μm. Basándose en estas observaciones, los cromosomas en escobilla se interpretan como versiones de cromosomas meióticos normales no espiralizados ni plegados.

Las dos imágenes de cromosomas en escobilla de la Figura 12.7 proporcionan ideas importantes sobre su morfología. En la Figura 12.7(a) se muestra la configuración meiótica al microscopio óptico. En el eje de cada una de ellas hay un gran número de áreas condensadas, que se repiten a lo largo del mismo, y que en general se refieren a **cromómeros**. Surgiendo de cada cromómero hay un par de lazos laterales, que dan al cromosoma su aspecto particular.

En la Figura 12.7(b), la micrografía electrónica de rastreo (SEM) muestra una ampliación que revela la presencia de lazos adyacentes a lo largo de uno de los dos ejes del cromosoma. Como ocurre con las bandas de los cromosomas politénicos, en cada lazo hay mucha mayor cantidad de DNA del necesario para codificar un solo gen. Esta imagen de SEM proporciona una imagen clara de los cromómeros y de

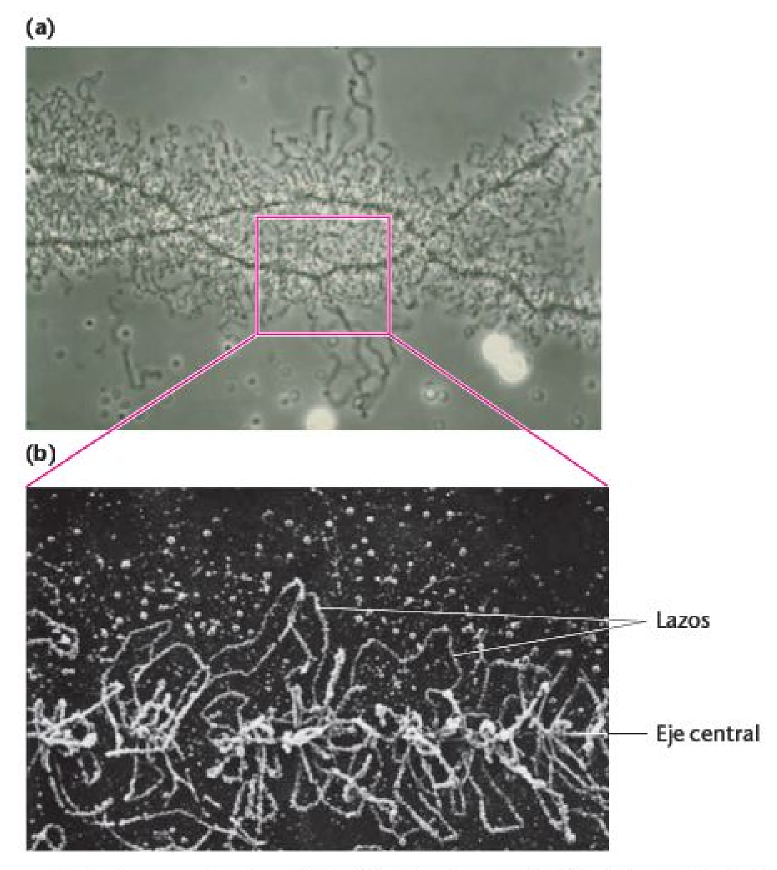


FIGURA 12.7 Cromosoma en escobilla de un oocito de anfibio. (a) Fotomicrografía; (b) micrografía electrónica de rastreo.

las fibras cromosómicas que sales de ellos. Se cree que cada lazo cromosómico está formado por una doble hélice de DNA, mientras que el eje central está formado por dos hélices. Esta hipótesis es congruente con la creencia de que cada cromosoma meiótico está formado por un par de cromátidas hermanas. Utilizando precursores radioactivos del RNA se demuestra que los lazos son activos en síntesis de RNA. Los lazos de estos cromosomas, de manera similar a los *puffs* de los cromosomas politénicos, representan DNA que se ha desespiralizado del eje cromomérico central durante la transcripción.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cuál es la base experimental que permite concluir que los *puffs* de los cromosomas politénicos y los lazos de los cromosomas en escobilla son áreas de intensa transcripción de RNA?

12.4 El DNA se organiza en cromatina en los eucariotas

Ahora nos fijaremos en la manera en que el DNA se organiza en los cromosomas eucarióticos. Nos centraremos en las células eucarióticas convencionales, en los que el DNA y las proteínas se acomplejan en una estructura nucleoproteica denominada **cromosoma**. Los cromosomas, que sólo son visibles durante la mitosis, están formados por fibras de cromatina estrechamente espiralizadas. Tras la división celular, cuando las células entran en el estadio de interfase del ciclo celular, la cromatina se desespiraliza y los cromosomas desaparecen. Durante la interfase, la cromatina se encuentra dispersa en el núcleo, y se replica el DNA de cada cromosoma. Al continuar el ciclo celular, gran parte de las células vuelven a entrar en mitosis, en la que la cromatina se espiraliza de nuevo en cromosomas visibles. Esta condensación representa una contracción de unas 10.000 veces para cada fibra de cromatina.

La organización del DNA durante las transiciones que se acaban de describir es mucho más intrincada y compleja que en virus y en bacterias, que nunca muestran un proceso complejo parecido a la mitosis. Esta complejidad se debe a la mayor cantidad de DNA por cromosoma y a la presencia de grandes cantidades de proteínas asociadas al DNA eucariótico. Por ejemplo, mientras el DNA del cromosoma de *E. coli* tiene 1.200 μm de longitud, el DNA de los cromosomas humanos tiene una longitud que va de 19.000 a 73.000 μm. En un solo núcleo humano, los 46 cromosomas contienen, en conjunto, suficiente DNA para alcanzar casi 2 metros de longitud. Este material genético, junto con las proteínas asociadas a él, está contenido dentro de un núcleo que normalmente mide 5 μm de diámetro.

Esta complejidad se parangona a la diversidad estructural y bioquímica de los muchos tipos de células eucarióticas presentes en un organismo pluricelular. Células diferentes asumen funciones específicas basadas en actividades bioquímicas altamente específicas. Aunque todas las células contienen un complemento genético completo, las diferentes células activan diferentes grupos de genes, por lo que debe haber un sistema regulador ordenado que gobierne la lectura de esta información. Dicho sistema debe estar impuesto por la estructura molecular del material genético, o relacionado con ella.

Debido a las limitaciones de la microscopía óptica, los primeros estudios de la estructura del material genético eucariótico se centraron en los cromosomas intactos, con preferencia en los más grandes, como los cromosomas politénicos y los cromosomas en escobilla. Posteriormente, las nuevas técnicas de análisis bioquímico, junto con la observación de cromatina eucariótica relativamente intacta y de cromosomas mitóticos con el microscopio electrónico, ha incrementado enormemente la comprensión de la estructura de los cromosomas.

La estructura de la cromatina y los nucleosomas

Como ya hemos visto, el material genético de los virus y las bacterias consiste en DNA o RNA prácticamente desprovisto de proteínas. En la cromatina eucariótica, hay una cantidad substancial de proteína asociada al DNA cromosómico en todas las fases del ciclo celular. Las proteínas asociadas se clasifican en **histonas** cargadas positivamente (básicas), y en las **no histonas**, con una carga positiva menor. De las proteínas asociadas al DNA, las histonas desempeñan claramente la función estructural más esencial. Las histonas contienen grandes cantidades de los aminoácidos lisina y arginina, que están cargados positivamente, lo que les posibilita unirse electrostáticamente a los grupos fosfato de los nucleótidos, cargados negativamente. Recuerde que se ha propuesto una interacción similar para varias proteínas bacterianas. Hay cinco tipos principales de histonas (Tabla 12.2).

El modelo general de la estructura de la cromatina se basa en la suposición de que las fibras de cromatina, compuestas por DNA y proteína, experimentan un gran enrollamiento y plegamiento al condensarse dentro del núcleo celular.

TABLA 12.2 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS HISTONAS

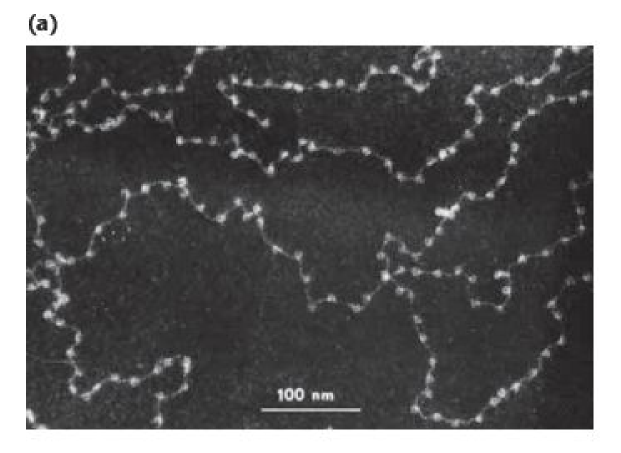
Tipo de histona	Contenido en lisina y en arginina	Peso molecular (Da)
H1	Rica en lisina	23.000
H2A	Ligeramente rica en lisina	14.000
H2B	Ligeramente rica en lisina	13.800
H3	Rica en arginina	15.300
H4	Rica en arginina	11.300

Las investigaciones de difracción de rayos X confirman que las histonas desempeñan una función importante en la estructura de la cromatina. La cromatina produce anillos de difracción regularmente espaciados, lo que sugiere que hay unidades estructurales repetidas a lo largo del eje de la cromatina. Si las moléculas de histona se eliminan químicamente de la cromatina, se rompe la regularidad de este patrón de difracción.

El modelo básico de la estructura de la cromatina se realizó a mediados de la década de 1970. Hay varias observaciones relevantes para el desarrollo de este modelo:

1. La digestión de la cromatina con determinadas nucleasas, como la nucleasa de micrococo, produce fragmentos de DNA de aproximadamente 200 pares de bases o de múltiplos de esta longitud. Esto demuestra que la digestión enzimática no es aleatoria, ya que si lo fuese, esperaríamos un amplio repertorio de tamaños. Por lo tanto, la cromatina está formada por algún tipo de unidad repetida, protegida del corte enzimático excepto en el sitio donde se unen dos de estas unidades. Estos sitios entre las unidades es donde corta la enzima.
2. Observaciones de la cromatina con el microscopio electrónico han revelado que las fibras de cromatina están compuestas por partículas esféricas dispuestas linealmente (Figura 12.8). Descubiertas por Ada y Donald Olins, las partículas están dispuestas en el eje de la cromatina de manera regular y parecen las cuentas de un collar. Estas partículas, que inicialmente se denominan cuerpos ν^3, actualmente se conocen como **nucleosomas**. Estos descubrimientos concuerdan perfectamente con la propuesta inicial, que sugiere la existencia de unidades que se repiten.
3. Los resultados de las investigaciones de las interacciones precisas entre las moléculas de histona y el DNA en los nucleosomas que forman la cromatina han demostrado que las histonas H2A, H2B, H3, y H4 producen dos tipos de tetrámeros: $(H2A)_2 \cdot (H2B)_2$; y $(H3)_2 \cdot (H4)_2$. Roger Kornberg predijo que cada unidad nucleosómica repetida está formada por un tetrámero de cada tipo, asociado a unos 200 pares de bases de DNA. Esta estructura es congruente con las observaciones anteriores y proporciona la base del modelo que explica la interacción entre las histonas y el DNA en la cromatina.
4. Cuando se incrementa el tiempo de digestión con la nucleasa, se eliminan del nucleosoma algunos de los segmentos de 200 pares de bases de DNA, obteniéndose lo que se denominan **partículas nucleares del nucleosoma,** que contienen 147 pares de bases. Este número es congruente en todos los organismos examinados. El DNA perdido en esta digestión más prolongada es el responsable de unir los nucleosomas entre sí. Este **DNA de unión** está asociado a la histona H1.
5. Basándose en la información anterior y en el análisis de dispersión de rayos X y de neutrones de partículas nucleares cristalizadas realizado por John T. Finch, por Aaron Klug y por otros científicos, en 1984 se propuso un modelo detallado del nucleosoma. En este modelo, el núcleo de DNA de 147 pares de bases está enrollado alrededor de un octámero de histonas en una superhélice levógira, completando 1,7 vueltas por nucleosoma.

(a)



(b)

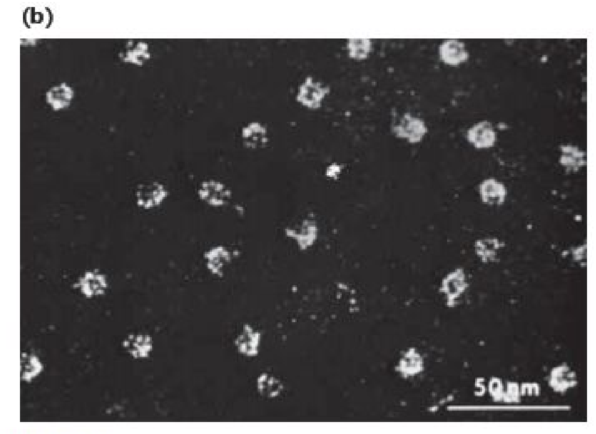


FIGURA 12.8 (a) Micrografía electrónica en campo oscuro de los nucleosomas presentes en la cromatina de núcleos de eritrocitos de pollo. (b) Micrografía electrónica en campo oscuro de nucleosomas producidos por digestión con la nucleasa de micrococo.

Las extensas investigaciones de los nucleosomas proporcionan la base para predecir como se produce el empaquetamiento de la cromatina en el núcleo y cómo se espiraliza para formar el cromosoma mitótico. En la Figura 12.9 se muestra este modelo. La molécula de DNA de 2 nm se enrolla inicialmente en un nucleosoma que mide unos 11 nm de diámetro [Figura 12.9(a)], lo que es congruente con la dimensión mayor del

[3] *Nota del traductor:* ν es la letra griega *nu*.

Seminario Web 12.1
Estructura cromosómica

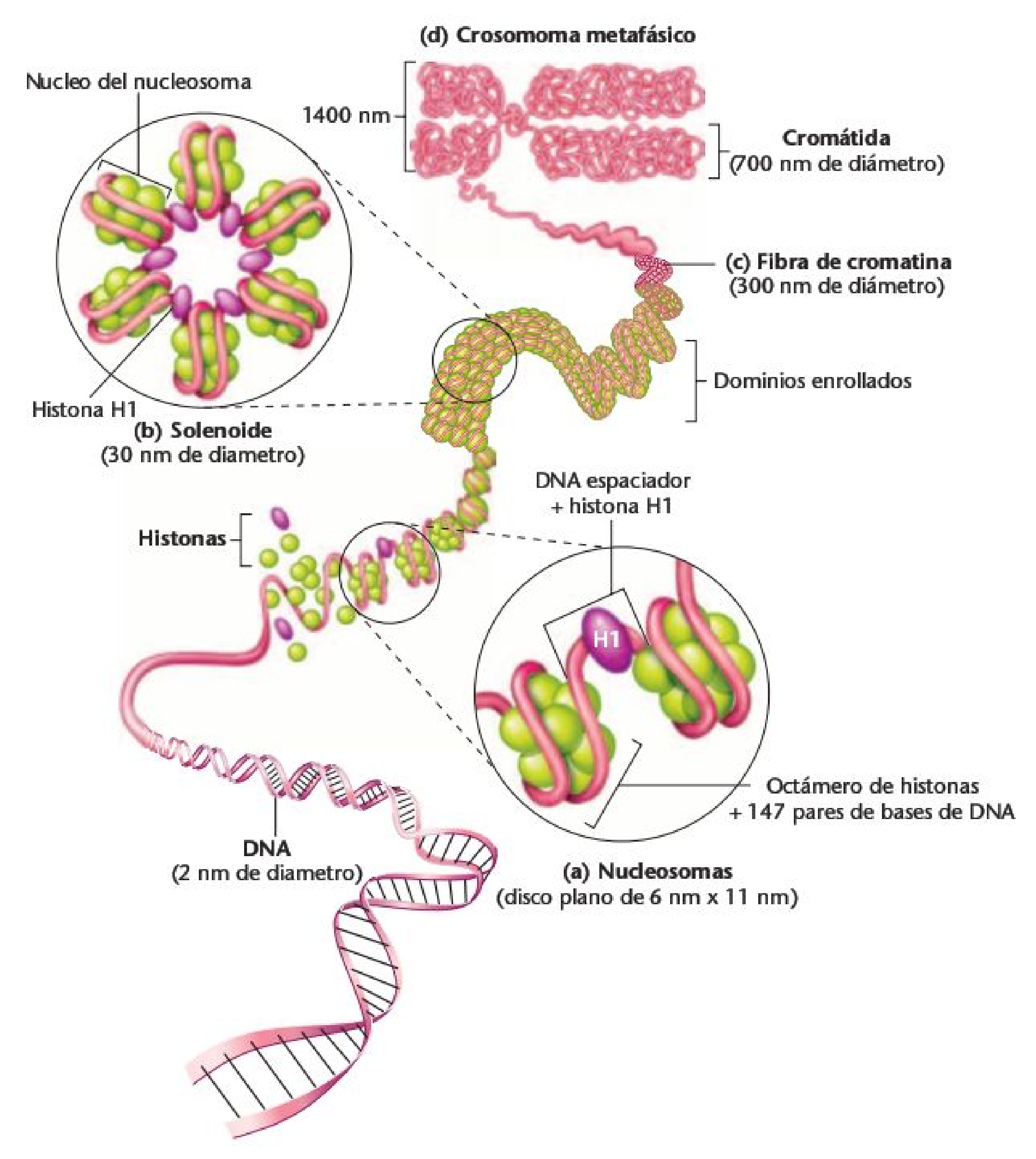


FIGURA 12.9 Modelo general de asociación entre histonas y DNA en el nucleosoma, que esquematiza la manera en que la fibra de cromatina podría enrollarse en estructuras más condensadas, produciendo al final un cromosoma mitótico.

nucleosoma elipsoidal. La formación del nucleosoma representa el primer nivel de empaquetamiento del DNA, en el que la hélice, al enrollarse alrededor de las histonas, reduce a un tercio su longitud original.

La fibra de cromatina extendida descrita en el párrafo anterior rara vez se encuentra de esta forma en el núcleo. En su lugar, la fibra de cromatina de 11 nm se empaqueta todavía más en una estructura más gruesa de 20 nm, que inicialmente recibió el nombre de solenoide [Figura 12.9(b)]. Esta fibra está formada por nucleosomas estrechamente enrollados, lo que genera el segundo nivel de empaquetamiento. Los detalles exactos de esta estructura todavía no han sido completamente clarificados, pero las fibras de cromatina de 30 nm se ven de modo característico con el microscopio óptico.

En la transición hasta el cromosoma mitótico se produce otro nivel de empaquetamiento. La estructura de 30 nm forma una serie de dominios en forma de lazo que condensan todavía más la fibra de cromatina, cuyo diámetro es ahora de 300 nm [Figura 12.9(c)]. Entonces las fibras se enrollan en los brazos del cromosoma que constituyen una cromátida, que a su vez forma parte del cromosoma metafásico [Figura 12.9(d)]. Aunque en esta figura se muestra que los brazos de la cromátida miden 700 nm de diámetro, sin duda este valor varía entre diferentes organismos. Si el valor es de 700 nm, un par de cromátidas hermanas que constituyen un cromosoma miden unos 1.400 nm.

La importancia de la organización del DNA en cromatina y de la cromatina en cromosomas mitóticos puede ilustrarse si

se considera una célula humana que almacena su material genético en un núcleo de unos 5 a 10 μm de diámetro. El genoma haploide contiene más de 3 mil millones de pares de bases de DNA distribuidos entre 23 cromosomas. La célula diploide contiene el doble. A 0,34 nm por cada par de bases, esto suma una gran cantidad de DNA (como se dijo antes, casi 2 metros)! Se estima que el DNA presente en un núcleo humano típico se organiza en unos 25×10^6 nucleosomas.

En la transición total de una hélice de DNA totalmente extendida hasta el estado extremadamente condensado de un cromosoma mitótico, debe alcanzarse una tasa de empaquetamiento (relación entre la longitud de DNA y la longitud de la estructura que lo contiene) de unos 500. De hecho, nuestro modelo justifica una tasa de empaquetamiento solo de 50. Obviamente, la fibra debe doblarse y enrollarse más para empaquetarse de manera aún más condensada durante la formación del cromosoma mitótico.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué prueba experimental apoya la idea que la cromatina eucariótica existe en forma de nucleosomas repetidos, cada uno de los cuales consiste en unos 200 pares de bases y en un octámero de histonas?

Ahora resuelva esto

El Problema 12.16 de la página 348 le pregunta hasta qué punto todo el contenido diploide del DNA humano se puede colocar en un núcleo.

Sugerencia: Asumiendo que el núcleo sea una esfera perfecta, empiece con la fórmula $V = (4/3\ \pi r^3)$.

Análisis de alta resolución del núcleo del nucleosoma

Como en muchos descubrimientos importantes en genética, el estudio de los nucleosomas ha dado respuesta a muchas preguntas importantes pero al mismo tiempo ha generado nuevas preguntas. Por ejemplo, en la discusión anterior, hemos establecido que las proteínas histónicas desempeñan una función estructural importante en el empaquetamiento del DNA en los nucleosomas que forman la cromatina. Si bien ayudan a solucionar el problema estructural de cómo organizar una vasta cantidad de DNA dentro del núcleo eucariótico, surge un nuevo problema. Cuando la fibra de cromatina se acompleja con las histonas y se pliega en los diversos niveles de compactación, hace que el DNA sea inaccesible a la interacción con proteínas no histónicas importantes. Por ejemplo, las diversas proteínas que tienen funciones enzimáticas y de regulación durante el proceso de replicación y de expresión génica deben interaccionar directamente con el DNA. Para acomodar estas interacciones proteína-DNA, se deben inducir cambios en la estructura de la cromatina, un proceso que actualmente se conoce como **remodelación de la cromatina**. En el caso de la replicación y de la expresión génica, la cromatina debe relajar su estructura compacta y exponer regiones de DNA a las proteínas reguladoras, pero también debe ser capaz de invertir el proceso durante los períodos de inactividad.

En 1997, cuando Timothy Richmond y los miembros de su equipo de investigación fueron capaces de mejorar de manera significativa el nivel de resolución de los estudios de difracción de rayos X de los cristales de nucleosomas (de los 7 Å de los estudios de 1984 a los 2,8 Å de los estudios de 1997), se dieron a conocer ideas de cómo se pueden lograr los diferentes estados de la estructura de la cromatina. En la Figura 12.10 se muestra un modelo basado en este trabajo. A esta resolución es posible ver la mayor parte de los átomos, lo que revela los sutiles giros y vueltas de la superhélice de DNA rodeando las histonas. Recuerde de la discusión anterior que la cinta de doble hélice representa 147 bp de DNA que rodean cuatro pares de proteínas histónicas. Esta configuración se repite una y otra vez a lo largo de la fibra de cromatina, y es la principal unidad de empaquetamiento del DNA en el núcleo eucariótico.

El trabajo de Richmond y sus colaboradores, que se vio ampliado a una resolución de 1,9 Å en 2003, ha revelado los detalles de la localización de cada histona concreta en el nucleosoma. La observación de que existen colas de histonas sin estructura que no están empaquetadas en los dominios histónicos plegados dentro del núcleo del nucleosoma es especialmente importante para la discusión de la remodelación de la cromatina. Por ejemplo, hay colas desprovistas de cualquier estructura secundaria que se extienden desde las histonas H3 y H2B, y que sobresalen a través de los canales del surco menor de la hélice de DNA. Parece que las colas de histona H4 establecen conexiones entre nucleosomas adyacentes. La importancia de las colas de las histonas es que proporcionan dianas potenciales para diversas interacciones químicas que podrían estar relacionadas con las funciones genéticas a lo largo de la fibra de cromatina.

Actualmente se sabe que varias de estas interacciones químicas potenciales son importantes para la función genética. Una de las modificaciones histónicas mejor estudiadas implica una **acetilación**, como consecuencia de la acción de la histona acetiltransfersasa (HAT). Esta enzima añade un grupo acetil al grupo amino cargado positivamente presente en la cadena lateral del aminoácido lisina, lo que cambia la carga neta de la proteína al neutralizar la carga positiva. Las lisinas son abundantes en las histonas, y ya hace tiempo que se sabe que la acetilación está relacionada con la activación génica. Parece ser que altos niveles de acetilación desespiralizan la fibra de cromatina, un efecto que se encuentra incrementado en las regiones con genes activos y disminuida en las regiones inactivas. Un ejemplo bien conocido es la inactivación del cromosoma X que forma el corpúsculo de Barr en mamíferos (véase el Capítulo 7), en que la histona H4 está muy poco acetilada.

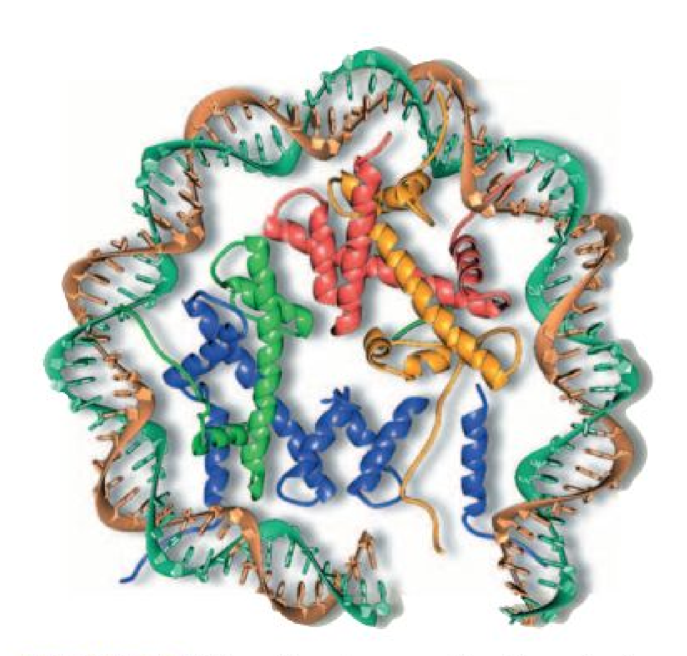


FIGURA 12.10 Núcleo del nucleosoma obtenido mediante análisis de cristalografía de rayos X a una resolución de 2,8 A.

Las otras dos modificaciones químicas importantes son la **metilación** y la **fosforilación** de aminoácidos que forman parte de las histonas. Estos procesos químicos son el resultado de la acción de las enzimas denominadas metiltransferasas y quinasas, respectivamente. Los grupos metilo pueden añadirse a la arginina y a la lisina de las histonas, y este cambio se ha relacionado con la activación de genes. Los grupos fosfato pueden añadirse a los grupos hidróxilo de los aminoácidos serina e histidina, lo que introduce una carga negativa en la proteína. Se sabe que en momentos característicos del ciclo celular incrementa la fosforilación de la histona H3. Se cree que esta modificación química está relacionada al ciclo de desespiralización y condensación de la cromatina que se produce durante y después de la replicación del DNA.

Es interesante destacar que, si bien la metilación de las histonas en los nucleosomas presenta una correlación positiva con la actividad génica en los eucariotas, la metilación de la base nitrogenada citosina en las cadenas polinucleotídicas del DNA, que forma la **5-metil citosina**, presenta una correlación negativa con la actividad génica. La mayoría de las veces la metilación se produce cuando el nucleótido ácido citidílico está al lado del nucleótido ácido guanílico (formando lo que se denomina un **islote CpG**).

La discusión anterior amplia nuestro conocimiento de la organización de los nucleosomas y la cromatina, y puede servir de introducción general al concepto de remodelación de la cromatina. Todavía hay mucho trabajo por realizar para elucidar la función específica de la remodelación de la cromatina en los procesos genéticos. En particular, la manera en que estas modificaciones se ven influenciadas por moléculas reguladoras de las células proporcionará ideas importantes para la comprensión de la expresión génica. Lo que está claro es que las formas dinámicas en que se presenta la cromatina tienen una importancia vital para la manera como se ejecutan todos los procesos genéticos en los que el DNA se encuentra directamente implicado. Trataremos de manera más detallada la función de la remodelación de la cromatina cuando consideremos la regulación de la expresión génica en eucariotas, en el Capítulo 17.

Heterocromatina

La discusión de la sección anterior implica que cada cromosoma eucariótico consiste, en toda su extensión, en una molécula continua de DNA de doble hélice con nucleosomas repetidos, lo que podría llevar a creer que todo el cromosoma es estructuralmente uniforme. Sin embargo, a principios del siglo XX se observó que, si bien la mayor parte del cromosoma se encuentra presente como cromatina desespiralizada, algunas partes permanecen condensadas y se tiñen fuertemente durante la interfase. En 1928, se acuñaron los términos **heterocromatina** y **eucromatina** para describir las partes de los cromosomas que permanecían condensadas y las que no estaban enrolladas, respectivamente.

Investigaciones posteriores han revelado diversas características de la heterocromatina que la distinguen de la eucromatina. Las áreas heterocromáticas son genéticamente inactivas porque no contienen genes o porque los genes que contienen son inactivos. Además, la heterocromatina se replica más tarde que la eucromatina durante la fase S del ciclo celular. El descubrimiento de la heterocromatina proporcionó las primeras pistas de que partes de los cromosomas eucarióticos no siempre codifican proteínas.

La heterocromatina se encuentra en diferentes regiones de los cromosomas eucarióticos. Las primeras investigaciones citológicas ya revelaron que los centrómeros están compuestos de heterocromatina. Los extremos de los cromosomas, denominados telómeros, también son heterocromáticos. De hecho, en algunos casos todo un cromosoma es heterocromático. Este es el caso del cromosoma Y de mamíferos, que en su mayoría es genéticamente inerte. Y, como se expuso en el Capítulo 7, el cromosoma X inactivado de las hembras de mamífero se condensa en la heterocromatina inerte del corpúsculo de Barr. En algunas especies, como las chinches de la harina, todos los cromosomas de uno de los conjuntos haploides es heterocromático.

A veces, cuando determinadas áreas heterocromáticas de uno de los cromosomas se translocan a un nuevo sitio del mismo cromosoma o de un cromosoma no homólogo, áreas que antes eran genéticamente activas se convierten en genéticamente inertes si yacen al lado de la heterocromatina translocada. Como se vio en el Capítulo 4, esta influencia sobre la eucromatina existente es un ejemplo de lo que generalmente se denomina **efecto de posición**. Es decir, la posición de un gen o de un grupo de genes en relación a todo el resto de material genético puede afectar su expresión.

12.5 El bandeo cromosómico diferencia regiones a lo largo del cromosoma mitótico

Hasta 1970, los cromosomas mitóticos vistos con el microscopio óptico podían distinguirse sólo por sus tamaños relativos y por la posición de sus centrómeros. Incluso en organismos con un número haploide pequeño, a menudo hay dos o más cromosomas que no se pueden distinguir. Sin embargo nuevos procedimientos citológicos hicieron posible la tinción diferencial de los cromosomas mitóticos a lo largo de su eje. Estos métodos se denominan técnicas de bandeo cromosómico puesto que los patrones de tinción se parecen a las bandas de los cromosomas politénicos.

Mary Lou Pardue y Joe Gall diseñaron una de las primeras técnicas de bandeo cromosómico. Estos científicos encontraron que si se desnaturalizaban preparaciones cromosómicas de ratón por calor y después se trataban con el colorante Giemsa, surgía un patrón de tinción especial. Las regiones centroméricas de los cromosomas mitóticos eran las únicas que se teñían! Por ello este patrón de tinción se denominó **bandas C**. Es importante para la discusión que viene a continuación considerar que esta técnica citológica identifica un área específica del cromosoma formada por heterocromatina. En la Figura 12.11 se muestra un cariotipo humano teñido de este modo. Todos los cromosomas de ratón son telocéntricos, por lo que en esta especie la tinción se localiza en el extremo de cada cromosoma.

En esa misma época se desarrollaron otras técnicas de bandeo cromosómico. La más útil de todas produce un patrón de tinción diferencial a lo largo de cada cromosoma. Este método, que produce **bandas G** (Figura 12.12), implica la digestión de los cromosomas mitóticos con la enzima proteolítica tripsina, seguida de una tinción con Giemsa. La reacción de tinción diferencial refleja la heterogeneidad y la complejidad presentes a lo largo del cromosoma.



FIGURA 12.11 Preparación de cromosomas mitóticos humanos procesados para visualizar las bandas C. Sólo se tiñen los centrómeros.

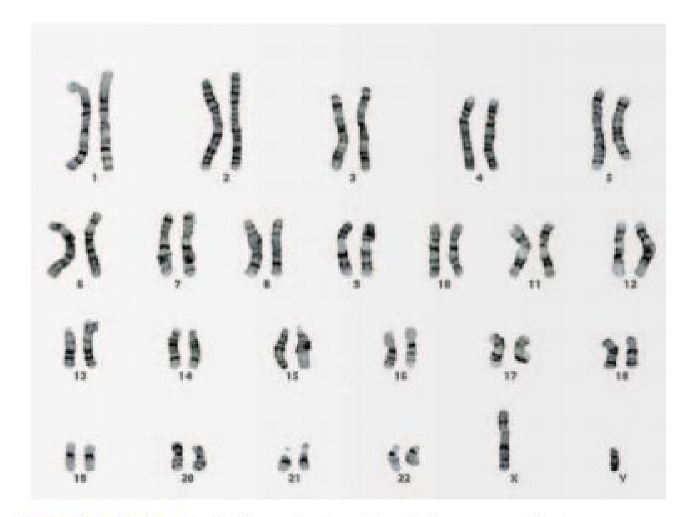


FIGURA 12.12 Cariotipo de bandas G de un varón humano normal. Los cromosomas provienen de células en metafase.

En 1971 se estableció una nomenclatura uniforme para los patrones de bandas de los cromosomas humanos basada en las bandas G. La Figura 12.13 muestra la aplicación de esta nomenclatura al cromosoma X. A la izquierda del cromosoma se muestran los diversos niveles de organización de los brazos p y q que pueden identificarse, mientras que la nomenclatura de la derecha identifica las regiones específicas dentro de cada región concreta del cromosoma.

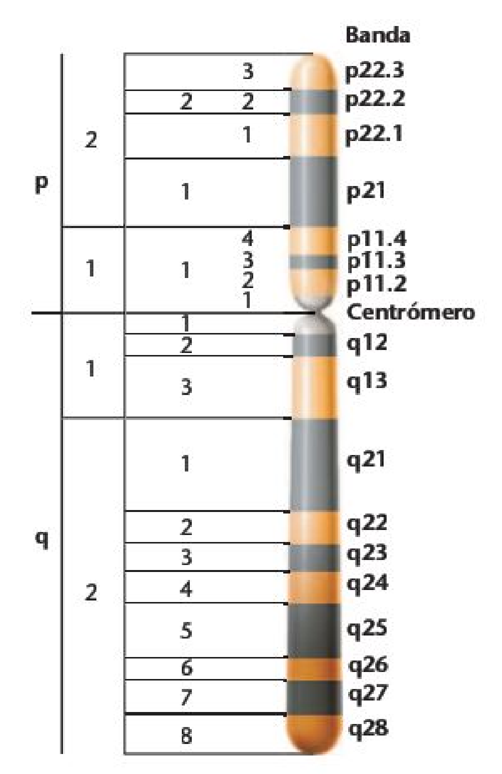


FIGURA 12.13 Regiones del cromosoma X humano diferenciadas por su patrón de bandas. La nomenclatura de la derecha designa bandas específicas.

Aunque no se conocen con precisión los mecanismos moleculares implicados en la producción de los diversos patrones de bandas, la importancia del bandeo ha sido enorme para el análisis citogenético, especialmente en humanos. El patrón de bandas de cada cromosoma es único, lo que permite distinguir incluso entre aquellos cromosomas cuyo tamaño y localización del centrómero son idénticos (p.e. los cromosomas humanos 4 y 5, y 21 y 22). El patrón de bandas de cada cromosoma es tan preciso que permite distinguir los homólogos, y cuando un segmento de un cromosoma se translocado a otro cromosoma su origen puede determinarse con gran precisión.

12.6 Los cromosomas eucarióticos presentan una organización compleja caracterizada por el DNA repetitivo

Hasta ahora hemos examinado cómo el DNA se organiza *en* cromosomas en bacteriófagos, en bacterias y en eucariotas. Ahora vamos a examinar qué sabemos sobre la organización de unas secuencias particulares, las que se encuentran repetidas muchas veces *dentro* de un cromosoma eucariótico, que de manera genérica se denominan **DNA repetitivo**. Como veremos, en los genomas eucarióticos este fenómeno presenta muchas variaciones. Posteriormente, en el Capítulo 20, nos centraremos en cómo los genes se organizan *dentro* de los cromosomas.

En el Capítulo 10 aprendimos que, además de las secuencias de DNA únicas que forman los genes, en los cromosomas eucarióticos una gran cantidad de secuencias de DNA tienen una naturaleza repetitiva, y que en el genoma de los organismos se producen diversos niveles de repetición. Muchos trabajos han proporcionado ideas sobre el DNA repetitivo, lo que ha demostrado la existencia de diversas clases de estas secuencias, así como su organización. La Figura 12.14 resume las diversas categorías de DNA repetitivo, y le sirve de referencia en toda la discusión de esta sección.

La figura también muestra que algunos genes se encuentran presentes en más de una copia (denominados genes multicopia), cuya naturaleza es por lo tanto repetitiva. Sin embargo, la mayor parte de las secuencias repetitivas no pertenecen a genes. De hecho, no se conoce la función de la mayoría de las secuencias repetitivas, si es que tienen alguna. Trataremos 3 categorías principales: (1) la heterocromatina asociada a los centrómeros y la que forma los telómeros; (2) las repeticiones en tándem de secuencias de DNA cortas y largas; (3) secuencias transponibles que se encuentran diseminadas por todo el genoma de los eucariotas.

DNA satélite y DNA repetitivo

La composición nucleotídica del DNA (p.e., el porcentaje de pares G≡C versus A=T) de una especie concreta se refleja en su densidad, que puede medirse mediante centrifugación por equilibrio de sedimentación (que se introdujo en el Capítulo 10). Cuando se analiza DNA eucariótico mediante esta técnica, la mayor parte muestra un pico (o banda) mayoritario único de densidad uniforme. Sin embargo, también se observan uno o más picos que representan DNA cuya densidad difiere ligeramente. Este componente, denominado **DNA satélite**, representa una proporción variable del DNA total, dependiendo de la especie. En la Figura 12.15 se muestra el perfil de la banda

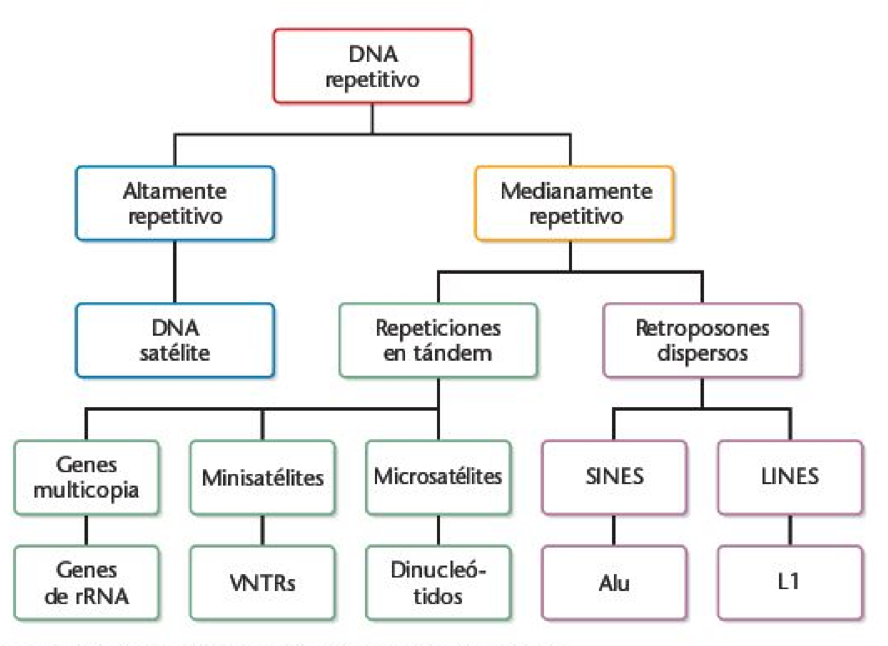


FIGURA 12.14 Esquema general de las diversas categorías de DNA repetitivo.

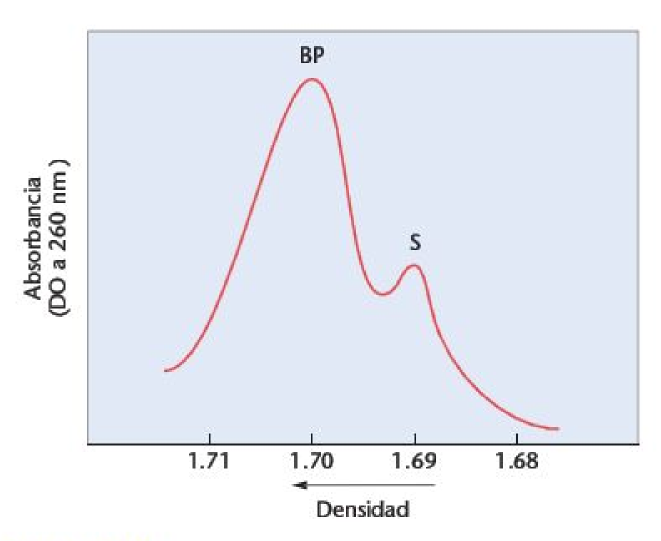


FIGURA 12.15 Separación de la banda principal de DNA (BP) y del DNA satélite (S) de ratón mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

principal y del DNA satélite de ratón. En cambio, los procariotas sólo contienen la banda principal de DNA, estando desprovistos de DNA satélite.

El significado del DNA satélite fue un enigma hasta mediados de la década de los 60, cuando Roy Britten y David Kohne desarrollaron una técnica para medir la cinética de reasociación de DNA que ha sido previamente disociado en cadenas sencillas (Capítulo 10). Estos investigadores demostraron que determinadas porciones de DNA se reasociaban con más rapidez que otras, y concluyeron que la reasociación rápida era característica de múltiples fragmentos de DNA compuestos por secuencias nucleotídicas idénticas o casi idénticas, lo que supone la base para el termino descriptivo **DNA repetitivo**. Recuerde que, en cambio, el DNA procariótico está prácticamente desprovisto de cualquier secuencia que no sea de copia única.

Cuando el DNA satélite se somete al análisis de cinética de reasociación, queda incluido en la categoría del *DNA altamente repetitivo*. Se sabe que este DNA está formado por secuencias cortas repetidas un gran número de veces. Nuevas pruebas sugirieron que estas secuencias están presentes como repeticiones en tándem agrupadas en áreas cromosómicas muy específicas, que se sabe que son heterocromáticas, las regiones que flanquean el centrómero. Esto se descubrió en 1969 cuando varios investigadores, entro los que cabe citar a Mary Lou Pardue y Joe Gall, aplicaron la técnica de **hibridación molecular** *in situ* para examinar el DNA satélite. Esta técnica (véase el Apéndice A) implica la hibridación molecular entre una fracción aislada de DNA o de RNA marcado radiactivamente y el DNA contenido en los cromosomas de una preparación citológica. Después del proceso de hibridación, se realiza una autorradiografía para localizar las áreas del cromosoma complementarias a la fracción de DNA o de RNA.

En su experimento, Pardue y Gall demostraron que las sondas moleculares hechas a partir del satélite de ratón hibridan con el DNA de las regiones centroméricas de los cromosomas mitóticos de ratón (Figura 12.16). Basándose en estos resultados, pueden establecerse las siguientes conclusiones. El DNA satélite difiere de la banda principal del DNA en su composición molecular, como establecen los experimentos de densidad de flotación. Éste está formado por secuencias repetitivas cortas. Finalmente, el DNA satélite está localizado en las regiones centroméricas heterocromáticas de los cromosomas.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos experimentalmente que el DNA satélite consiste en secuencias repetitivas, y que procede de regiones del centrómero?

Secuencias de DNA centromérico

Los centrómeros, citológicamente descritos a finales del siglo XIX como el *estrechamiento principal* de los cromosomas eucarióticos, desempeñan diversas funciones cruciales durante la mitosis y la meiosis. En primer lugar, son los responsables de mantener la cohesión entre cromátidas hermanas antes del estadio de anafase. Es precisamente por el centrómero donde las cromátidas hermanas permanecen emparejadas durante los estadios iniciales de la mitosis y la meiosis. Segundo, los centrómeros son el lugar donde se forma el cinetocoro, la plataforma proteinácea que se organiza alrededor del centrómero y que se une a los microtúbulos de las fibras del huso. De este modo los centrómeros median la migración de los cromosomas



FIGURA 12.16 Hibridación *in situ* entre una sonda radioactiva específica para el DNA satélite de ratón y cromosomas mitóticos. Los granos de la autorradiografía indican las regiones cromosómicas (los centrómeros) que contienen las secuencias de DNA satélite.

durante el estadio de anafase. Este proceso es esencial para la separación de las cromátidas, y por lo tanto para la fidelidad de la distribución de los cromosomas durante la división celular.

La mayoría de estimaciones de infidelidad durante la mitosis son enormemente bajas: de 1×10^{-5} a 1×10^{-6}, o de 1 error por cada 100.000 a 1 millón de divisiones celulares. En consecuencia, se ha supuesto que el análisis de la secuencia de DNA de las regiones centroméricas proporcionará ideas de las características especiales de esta región cromosómica. Esta región del DNA se denomina **CEN**, y actualmente ha sido investigada en diversos organismos.

El análisis de las regiones CEN de los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* proporcionó la base para el modelo descrito inicialmente por John Carbon y Louis Clarke. Puesto que cada centrómero tiene la misma función, no es sorprendente que se encontrase que la organización de todos los CEN es muy parecida. La región CEN de los 16 cromosomas de levadura está formada por unos 125 pares de bases, que pueden dividirse en tres regiones (Figura 12.17). Las regiones primera y tercera (I y III) son relativamente cortas y muy conservadas en los cromosomas de levadura, y consisten en 8 y 26 pares de bases respectivamente. La secuencia de la región II, que es más larga (80-85 pares de bases) y extremadamente rica en A=T (hasta el 95 por ciento), varía entre los diferentes cromosomas.

El análisis mutacional sugiere que las regiones I y II son menos importantes para la función del centrómero que la región III. A menudo, se toleran las mutaciones en estas dos primeras regiones, pero las mutaciones en la región III normalmente destruyen la función del centrómero. Si bien la secuencia de DNA de esta región podría ser esencial para la unión de las fibras del huso, estas secuencias no son exclusivas de cromosomas específicos, sino que pueden intercambiarse experimentalmente entre cromosomas sin que la función centromérica se vea alterada.

Basándose en los estudios en levadura, se supuso que en los eucariotas pluricelulares los hallazgos serían parecidos. Sin embargo, para sorpresa de los investigadores, la secuencia de DNA de organismos como los mamíferos, humanos inclusive, varía considerablemente y no se ha conservado tanto. Estas y otras observaciones han llevado a la conclusión de que, en estos organismos, las secuencias CEN no son esenciales por sí mismas para la función del centrómero.

La cantidad de DNA asociada al centrómero de los eucariotas pluricelulares es mayor que en la levadura. Recuerde de una exposición anterior de este capítulo que, en el ratón, el DNA satélite altamente repetitivo está localizado en las regiones centroméricas. El tamaño de estas secuencias, ausentes en la levadura, pero características de la mayoría de organismos pluricelulares, varía considerablemente. Por ejemplo, la secuencia de 10 pares de bases AATAACATAG está repetida muchas veces en tándem en el centrómero de los cuatro cromosomas de *Drosophila*. En la especie humana, una de las secuencias de DNA satélite más conocidas es la **familia alfoide**. Las secuencia alfoide, que se encuentran principalmente en las regiones centroméricas, presenta un motivo de 171 pares de bases que se repite ordenadamente en tándem hasta completar 3 millones de pares de bases. Si bien este motivo se encuentra también en otros primates estrechamente relacionados a los humanos, no se conserva ni la secuencia ni el número de repeticiones de 171 pares de bases. Aunque no se conoce con precisión la función de este DNA en la función del centrómero, se sabe que estas secuencias no se transcriben.

Secuencias de DNA telomérico

Otra estructura importante de los cromosomas es el **telómero**, que hemos tratado al inicio de este capítulo y en el Capítulo 11 cuando consideramos los problemas asociados con la replicación del DNA telomérico. La función de los telómeros, que se encuentran en el extremo de los cromosomas lineales, es proporcionar estabilidad al cromosoma haciendo que sus extremos

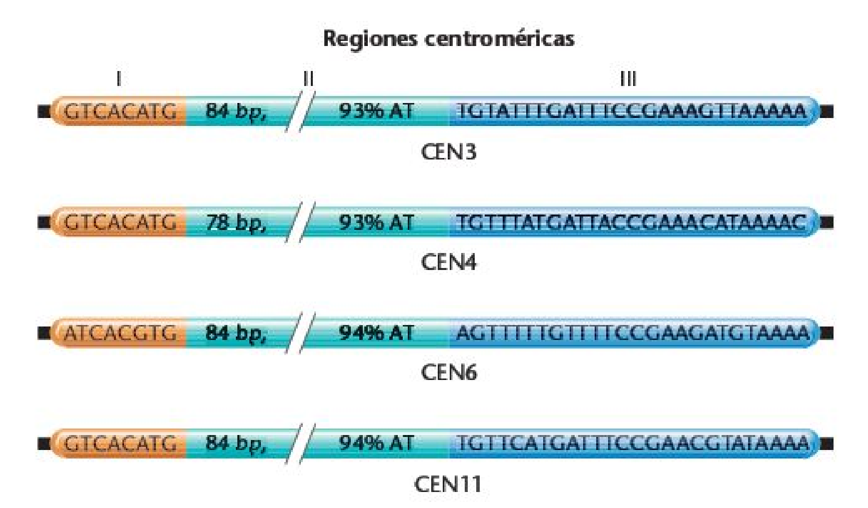


FIGURA 12.17 Información de la secuencia nucleotídica del DNA de las tres regiones centroméricas principales de los cromosomas 3, 4, 6 y 11 de levadura.

no interaccionen con los extremos de otros cromosomas. Al revés que en cromosomas rotos, cuyos extremos pueden unirse a otros extremos de cromosomas rotos, las regiones teloméricas no se unen entre ellas ni con extremos de cromosomas rotos. Se cree que algunos aspectos de la estructura molecular de los telómeros deben ser especiales si se comparan con la mayoría de las otras regiones cromosómicas.

Para abordar este problema, y como se hizo con los centrómeros, primero se investigaron los cromosomas de eucariotas unicelulares por ser más sencillos, como los de protozoos y los de levadura. Actualmente se cree que todos los telómeros de una misma especie pueden compartir una secuencia nucleotídica común.

Se han descubierto dos tipos de secuencias teloméricas. El primer tipo, denominado sencillamente **secuencias de DNA telomérico**, consiste en cortas repeticiones en tándem. Este grupo es el que contribuye a la estabilidad y a la integridad de los cromosomas. En el ciliado *Tetrahymena* hay más de cincuenta repeticiones de la secuencia hexanucleotídica GGGGTT. En la especie humana, la secuencia GGGATT se repite muchas veces. El análisis de las secuencias de DNA telomérico ha demostrado que están muy conservadas en la evolución, lo que refleja la función esencial que desempañan en el mantenimiento de la integridad de los cromosomas.

El segundo tipo, las **secuencias asociadas al telómero**, también son repetitivas y se encuentran tanto adyacentes al telómero como dentro del mismo. Estas secuencias varían entre organismos, y se desconoce su significado.

Es interesante destacar que los telómeros de *Drosophila* son fundamentalmente distintos de los encontrados hasta la fecha en cualquier otro organismo, puesto que están formados por elementos transponibles. Sin embargo todavía no se ha clarificado la importancia de este hallazgo.

Como se expuso en el Capítulo 11, la replicación de los telómeros precisa una enzima especial que contiene RNA, la **telomerasa**. Sin ella, el DNA de los extremos de los telómeros se va acortando en cada replicación. Puesto que los eucariotas unicelulares son células inmortalizadas, la telomerasa es esencial para su supervivencia. En organismos pluricelulares, como los humanos, la telomerasa es esencial en la línea germinal, pero no es activa en las células somáticas. El acortamiento de los cromosomas se considera una parte del proceso natural de envejecimiento celular, sirviendo de reloj interno. En células cancerígenas humanas, que se han inmortalizado, la transición a la malignidad parece precisar la activación de la telomerasa para superar la senescencia normal asociada al acortamiento de los cromosomas.

Secuencias moderadamente repetitivas: VNTRs y repeticiones de dinucleótidos

Una breve mención de otras categorías importantes de DNA repetitivo amplía la comprensión de la organización del genoma eucariótico. Además del DNA altamente repetitivo, que constituye aproximadamente el 5 por ciento del genoma humano (y el 10 por ciento del genoma de ratón), hay una segunda categoría de DNA repetitivo caracterizada mediante análisis C_0t bastante bien caracterizada, el **DNA moderadamente (o medianamente) repetitivo**. Puesto que se están aprendiendo muchas cosas del genoma humano, utilizaremos nuestra propia especie para mostrar la función de esta categoría de DNA en la organización del genoma.

Si bien el DNA moderadamente repetitivo no incluye algunos genes duplicados (como los que codifican el RNA ribosómico), las secuencias más destacadas de esta categoría comprenden repeticiones en tándem no codificantes y secuencias dispersas. No se ha atribuido ninguna función a estas secuencias. Un ejemplo son las denominadas **repeticiones en tándem de número variable (VNTR)**. La secuencia de DNA repetida o VNTR puede tener entre 15 y 100 pares de bases de longitud, y se encuentra entre genes y dentro de ellos. Muchas de estas agrupaciones se encuentran dispersas por todo el genoma, y a menudo se las denomina **microsatélites**.

El número de copias en tándem de cualquier secuencia específica en una localización concreta varía entre individuos, formando regiones localizadas de 1.000 a 20.000 pares de bases de longitud (de 1 a 20 kb). Como veremos en el Capítulo 22, la variación del tamaño de estas regiones entre los individuos de la especie humana fue originalmente la base de la técnica forense denominada **huella molecular de DNA**.

Otro grupo de secuencias repetidas en tándem consiste en di-, tri, tetra- y pentanucleótidos, también denominados **microsatélites**. Como los VNTRs, se encuentran diseminados por el genoma, y el número de repeticiones presentes en un sitio concreto también varia entre individuos. Por ejemplo, el microsatélite más común en humanos es el dinucleótido $(CA)_n$, en el que n representa el número de repeticiones. Lo más frecuente es que n se encuentre entre 5 y 50. Estas agrupaciones han sido muy útiles como marcadores moleculares durante el análisis del genoma.

Secuencias transpuestas repetitivas: SINES y LINES

Todavía otra categoría de DNA repetitivo consiste en secuencias que se encuentran dispersas por todo el genoma en vez de estar repetidas en tándem. Pueden ser cortas o largas, y muchas tienen la distinción añadida de ser **secuencias transponibles**, secuencias móviles que pueden moverse a otras localizaciones dentro del genoma. Una gran porción de los genomas eucarióticos está formada por estas secuencias.

Por ejemplo, los **elementos dispersos cortos**, denominados **SINE** (del inglés *short interspersed elements*), tienen menos de 500 pares de bases de longitud y pueden encontrarse hasta 500.000 o más en un genoma humano. Los SINE humanos mejor caracterizados son un conjunto de secuencias muy relacionadas denominadas **familia** *Alu* (el nombre se debe a la presencia de secuencias de restricción para la endonucleasa

*Alu*I). Los miembros de esta familia de DNA, que también se encuentran en otros mamíferos, tienen entre 200 y 300 pares de bases de longitud y se encuentran dispersos bastante uniformemente por todo el genoma, tanto entre genes como dentro de ellos. En humanos, esta familia comprende más del 5 por ciento del genoma completo.

Las secuencias *Alu* son especialmente interesantes, aunque su función, si es que tienen alguna, todavía no se ha encontrado. A veces, se transcriben miembros de la familia *Alu*. Se desconoce la función de este RNA, pero en algunos casos puede estar relacionada al hecho de que los elementos *Alu* pueden transponerse dentro del genoma. De hecho, se cree que las secuencias *Alu* han surgido de un elemento de RNA cuyo complementario de DNA se dispersó por el genoma como consecuencia de la actividad de la retrotranscriptasa (una enzima que sintetiza DNA a partir de un molde de RNA)[4].

El grupo de los **elementos dispersos largos (LINES)** representan otra categoría de secuencias de DNA repetitivas transponibles. En la especie humana, el ejemplo más destacable es la familia denominada **L1**. Los miembros de esta familia de secuencias tienen unos 6400 pares de bases de longitud y se estima que hay hasta 100.000 en el genoma. Su extremo 5′ es muy variable, y todavía no se ha definido su función en el genoma.

Actualmente se conoce la base de la transposición de los elementos L1. La secuencia de DNA de L1 se transcribe inicialmente a una molécula de RNA. Entonces el RNA sirve de molde para la síntesis del complementario de DNA utilizando la enzima transcriptasa reversa. Esta enzima está codificada en una porción de la secuencia de L1. La nueva copia de L1 se integra en el DNA del cromosoma en un nuevo sitio. Dada la similitud entre este mecanismo de transposición y el que usan los retrovirus, se dice que los LINES son **retroposones**.

Los SINES y los LINES representan una parte importante del DNA humano. Ambos tipos de elementos comparten la característica organizativa de estar formados, dentro del DNA de cada entidad, por una mezcla del 70 por ciento de secuencias únicas y del 30 por ciento de secuencias repetitivas. En conjunto, representan el 10 por ciento del genoma.

Genes multicopia moderadamente repetitivos

En algunos casos, el DNA moderadamente repetitivo incluye genes funcionales presentes en múltiples copias repetidas en tándem. Por ejemplo, los genes que codifican el RNA ribosómico se encuentran presentes en múltiples copias. *Drosophila* tiene 120 copias por genoma haploide. Unidades genéticas únicas codifican una larga molécula precursora que es procesada en los rRNA 5,8*S*, 18*S* y 28*S*. En humanos se encuentran múltiples copias de este gen agrupadas en el brazo p de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22. Las copias múltiples de los genes que codifican el rRNA 5*S* se transcriben de forma separada a partir de agrupaciones múltiples presentes en el extremo terminal del brazo p del cromosoma 1.

12.7 La inmensa mayoría del genoma eucariótico no codifica ningún gen funcional

Dada la información anterior sobre los distintos tipos de DNA repetitivo en eucariotas, es interesante plantear la siguiente pregunta: *¿Qué porcentaje del genoma eucariótico codifica realmente genes funcionales?* En conjunto, los distintos tipos de DNA altamente repetitivo y moderadamente repetitivo constituyen hasta el 40 por ciento del genoma humano. Estas observaciones son generales en los eucariotas. Además del DNA repetitivo, hay una gran cantidad de secuencias de DNA de copia única definidas según el análisis C_0t que parecen ser no codificantes. Una pequeña parte de ellas son **pseudogenes**, que representan vestigios evolutivos de copias duplicadas de genes que han experimentado suficientes mutaciones como para que ya no sean funcionales. En algunos casos hay múltiples copias de estos genes.

Aunque la proporción del genoma que está formada por DNA repetitivo varía entre organismos, hay una característica que parece estar compartida: *sólo una pequeña parte del genoma codifica proteínas*. Por ejemplo, los 20.000 a 30.000 genes que codifican proteínas en el erizo de mar ocupan menos del 10 por ciento de su genoma. En *Drosophila*, sólo el 5-10 por ciento de su genoma está ocupado por genes que codifican proteínas. En la especie humana, parece que los 20.000 a 25.000 genes funcionales estimados ocupan menos del 5 por ciento del genoma.

El estudio de las diversas formas de DNA repetitivo ha incrementado significativamente la comprensión que tenemos de la organización del genoma. En el siguiente capítulo exploraremos la organización de los genes en los cromosomas.

[4] *Nota del traductor:* de hecho, los elementos de la familia Alu están flanqueados por secuencias repetidas directas, parecidas a las secuencias de inserción bacterianas, lo que apoya su origen como elementos transponibles (véase el Capítulo 15).

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Conocer la organización de los componentes moleculares que forman los cromosomas es fundamental para entender la función del material genético. Los cromosomas de los bacteriófagos y de los virus están desprovistos de proteínas asociadas y contienen moléculas de DNA equivalentes a las del modelo de Watson y Crick.
2. Los cromosomas politénicos y en escobilla son ejemplos de estructuras especializadas que han incrementado nuestro conocimiento sobre la organización y la función genética.
3. La fibra de cromatina eucariótica es una nucleoproteína organizada en unidades repetidas denominadas nucleosomas. El nucleosoma, que está formado por unos 200 pares de bases de DNA, por un octámero con cuatro tipos de histonas y por una histona de unión, facilita la conversión de la fibra de cromatina alargada característica de la interfase al cromosoma altamente empaquetado que se observa en la mitosis.
4. La heterogeneidad estructural del eje del cromosoma se ha establecido como resultado de investigaciones bioquímicas y citológicas. La heterocromatina, condensada prematuramente durante la interfase, es en su mayor parte genéticamente inerte. Algunos ejemplos de heterocromatina son las regiones centroméricas y teloméricas, el cromosoma Y y el corpúsculo de Barr.
5. El análisis de DNA ha revelado la existencia de secuencias nucleotídicas especiales en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas que parecen estar relacionadas con sus funciones respectivas.
6. Los genomas eucarióticos presentan una compleja organización de su secuencia caracterizada por numerosas categorías de DNA repetitivo.
7. El DNA repetitivo consiste en repeticiones en tándem agrupadas en diversas regiones del genoma y en secuencias repetidas no agrupadas en tándem distribuidas uniformemente por el genoma. En el primero de estos grupos, el tamaño de cada agrupación varía entre individuos, lo que proporciona una forma de identidad bioquímica. En el segundo grupo, las secuencias pueden ser cortas o largas, como las *Alu* y L1 respectivamente, y son elementos transponibles.
8. La mayor parte de un genoma eucariótico no codifica genes funcionales. En los humanos, por ejemplo, menos del 5 por ciento del genoma se usa para codificar los 20.000 a 25.000 genes encontrados en nuestro genoma.

IDEAS Y SOLUCIONES

Se encontró un organismo unicelular desconocido que vivía sobre el suelo oceánico, a gran profundidad. Su núcleo contenía sólo un cromosoma linear formado por 7×10^6 pares de nucleótidos de DNA unido a tres tipos de proteínas parecidas a las histonas.

1. Una digestión breve con la nucleasa de micrococo produjo fracciones de DNA de 700, 1.400, y 2.100 pares de bases. ¿Qué representan estas fracciones? ¿Qué conclusiones se pueden deducir?

Solución: La fibra de cromatina puede estar formada por una variedad de nucleosomas que contienen 700 pares de bases de DNA. Las fracciones de 1.400 y de 2.100 pares de bases representan, respectivamente, dos y tres nucleosomas unidos. La digestión enzimática puede haber sido incompleta, lo que generaría estas dos fracciones.

2. El análisis de nucleosomas individuales reveló que cada unidad contenía una copia de cada proteína, y que el corto DNA de unión no tenía ninguna proteína unida. Si todo el cromosoma está formado por nucleosomas (sin tener en cuenta el DNA de unión), ¿cuantos hay, y cuantas proteínas se necesitan para formarlos?

Solución: Puesto que el cromosoma contiene 7×10^6 pares de bases de DNA, y puesto que cada nucleosoma contiene 7×10^2 pares de bases, el número de nucleosomas es igual a

$$7 \times 10^6/7 \times 10^2 = 10^4 \text{ nucleosomas}$$

El cromosoma contiene 10^4 copias de cada una de las tres proteínas, es decir, contiene un total de 3×10^4 moléculas.

3. Luego, el análisis reveló que el DNA del organismo anterior era una doble hélice parecida a la del modelo de Watson-Crick, pero que contenía 20 pares de bases en cada vuelta de la hélice, que era dextrógira. El tamaño físico del nucleosoma era exactamente el doble del volumen de todos los otros eucariotas conocidos, ya que la distancia a lo largo del eje de la fibra estaba incrementado en un factor 2. Compare el grado de compactación de los nucleosomas de este organismo con los de los otros eucariotas.

Solución: Este organismo compacta un trozo de DNA formado por 35 vueltas completas de la hélice (700 pares de bases por nucleosoma/20 pares de bases por vuelta) en cada nucleosoma. Un eucariota normal compacta un trozo de DNA formado por 20 vueltas completas de la hélice (200 pares de bases por nucleosoma/10 pares de bases por vuelta) en un nucleosoma que tiene la mitad de volumen que el del organismo analizado. Por lo tanto, el grado de compactación es menor en este organismo.

4. En el cromosoma de este organismo no se producen enrollamientos ni compactaciones adicionales. Compare esta información con los datos que se conocen de los cromosomas eucarióticos. ¿Cree que un cromosoma humano de 7×10^6 pares de bases de longitud formará, en interfase, una fibra de cromatina más larga o más corta que la del organismo analizado?

Solución: El cromosoma eucariótico contiene otro nivel de condensación en forma de «solenoide», dependiente de la asociación de la molécula de histona H1 con el DNA de unión. Los solenoides condensan la fibra eucariótica unas 5 veces más. El cromosoma del organismo analizado está compactado en 10^4 nucleosomas, con una longitud del eje que es el doble de la longitud del eje de la fibra de cromatina eucariótica. La fibra eucariótica está formada por $7 \times 10^6/2 \times 10^2 = 3{,}5 \times 10^4$ nucleosomas, es decir, 3,5 veces más que el organismo analizado. Sin embargo, está compactado por un factor 5 en cada solenoide. Por lo tanto, el cromosoma del organismo analizado forma una fibra de cromatina más larga.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

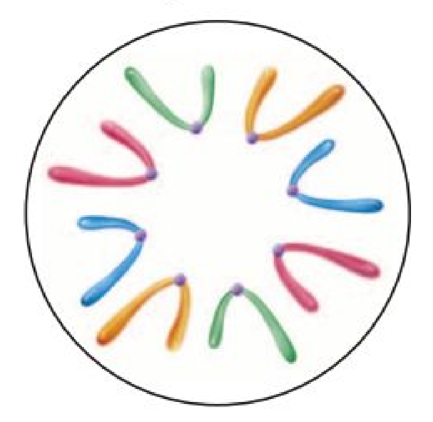
1. Compare el tamaño del cromosoma de los bacteriófagos λ y T2 con el de *E. coli*. ¿Cómo se correlaciona con el tamaño y la complejidad relativos de estos fagos y de la bacteria?
2. Los bacteriófagos y las bacterias contienen casi siempre su DNA en cromosomas circulares (lazos cerrados). El fago λ es una excepción, puesto que mantiene su DNA en un cromosoma lineal dentro de la partícula vírica. Sin embargo, en cuanto es inyectado en una célula huésped, antes de replicarse se circulariza. Teniendo en cuenta la información del Capítulo 11, que ventaja existe en replicar moléculas de DNA circular en comparación con las moléculas lineales?
3. Describa cómo se forman los cromosomas politénicos gigantes.
4. Se aíslan y se cultivan glándulas salivares de *Drosophila* en presencia de ácido timidílico tritiado. Se realiza una autoradiografía, que muestra los cromosomas politénicos. Prediga la distribución de granos a lo largo de los cromosomas.
5. ¿Qué proceso genético se produce en un *puff* de un cromosoma politénico?
6. Describa la estructura de las secuencias LINE. ¿Por qué se dice que las secuencias LINE son retroposones?
7. ¿Durante qué proceso genético se encuentran cromosomas en escobilla en los vertebrados?
8. ¿Por qué podemos predecir que la organización del material genético eucariótico será más compleja que la de virus y de bacterias?
9. Describa la secuencia de descubrimientos que condujo al desarrollo del modelo de la estructura de la cromatina.
10. ¿Cuál es la composición molecular y la ordenación de los componentes del nucleosoma?
11. Describa las transiciones que se producen al enrollarse y plegarse los nucleosomas para formar una cromátida.
12. Proporcione una definición detallada de la heterocromatina, y enumere tantos ejemplos como pueda.
13. Los mamíferos contienen un genoma diploide formado por, al menos, 10^9 pares de bases. Si todo este DNA se encuentra en forma de fibra de cromatina, en la que cada grupo de 200 pares de bases se combina con 9 histonas en un nucleosoma, y donde cada grupo de 6 nucleosomas se combina en un solenoide, alcanzando una proporción de empaquetamiento final de 50, determine (a) el número total de nucleosomas de la fibra, (b) el número total de moléculas de histona que se encuentran combinadas con el DNA en el genoma diploide, y (c) la longitud combinada de todas las fibras.
14. Suponga que una molécula de DNA vírico forma una cadena circular de 50 μm de longitud y tiene un diámetro uniforme de 20 Å. Si esta molécula está contenida en una cápside vírica esférica con un diámetro de 0,08 μm, ¿encajará la molécula de DNA en la cápside vírica, suponiendo que la molécula es completamente flexible? Demuestre su respuesta matemáticamente.
15. ¿Cuantos pares de bases hay en una molécula del fago de DNA T2, que tiene 52 μm de longitud?
16. Si un núcleo humano tiene 10 μm de diámetro y debe contener hasta 2 m de DNA, que está acomplejado en nucleosomas con un diámetro de 11 nm cuando está completamente extendido, ¿qué porcentaje del volumen del núcleo está ocupado por el material genético?

Problemas extra-picantes

17. Sun y sus colaboradores (2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 99:8695-8700) analizaron ejemplares de *Drosophila* a los que se había introducido (utilizando un vector plasmídico) dos genes normales activos w^+ (alelo silvestre del gene ojos blancos, denominado *white* en inglés) en regiones cromosómicas eucromáticas y heterocromáticas. Se valoró la actividad de cada gen, cuyos datos aproximados se muestran a continuación. Considerando las tres características de la heterocromatina, ¿cuál o cuáles se ven apoyadas por estos datos experimentales?

	Actividad (porcentaje relativo)	
Gen	**Eucromatina**	**Heterocromatina**
hsp26	100%	31%
w^+	100%	8%

18. Utilizando métodos moleculares para «marcar» cromosomas con colorantes fluorescentes, Nagele y sus colaboradores (1995. *Science* 270: 1831-35) observaron la posición nuclear precisa de los cromosomas en fibroblastos humanos durante el estadio inicial de la mitosis (prometafase). A continuación se muestra un esquema realizado a partir de los datos de esta investigación, en el que se observa la posición relativa de los cromosomas 7, 8, 16 y X. Los cromosomas homólogos están representados con el mismo color. Suponiendo que este patrón sea igual en otras células humanas, ¿qué conclusiones pueden extraerse respecto las posiciones nucleares de los cromosomas durante la interfase y las fases iniciales de la mitosis? ¿Cómo puede influir la localización de los cromosomas la función génica durante la interfase?



19. Si bien todavía queda mucho por aprender sobre la función de los nucleosomas y la estructura y la función de la cromatina, investigaciones recientes indican que la modificación *in vivo* de las histonas está asociada a cambios de actividad génica. Por ejemplo, Berstein y sus colaboradores (2000. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 97: 5340-45) determinaron que la acetilación de las histonas H3 y H4 en levaduras está asociada a un incremento de actividad génica del 21,1 y del 13,8 por ciento respectivamente, y que su heterocromatina se encuentra hipermetilada con respecto a la media de su genoma. Especule sobre el significado de estos hallazgos en términos de la interacción nucleosoma-DNA y de actividad génica.

20. En un artículo titulado «Posición del nucleosoma en la horquilla de replicación» (*«Nucleosome positioning at the replication fork»*), Lucchini y sus colaboradores (2002. EMBO 20: 7294-302) dicen: «tanto los nucleosomas "viejo" segregados al azar como los "nuevos" octámeros de histonas recién ensambladas ocupan rápidamente su posición (en cuestión de segundos) en la cadena de DNA recién sintetizada». Dada esta afirmación, ¿cómo se compararía la distribución de nucleosomas y de DNA en la cromatina recién replicada? ¿Cómo se podría probar experimentalmente la distribución de nucleosomas en los cromosomas recién replicados?

21. El genoma humano contiene aproximadamente 10^6 copias de la secuencia *Alu* por genoma haploide, una de las clases de elementos cortos dispersos (SINE) mejor estudiadas. Las secuencias *Alu* concretas comparten una secuencia consenso de 282 nucleótidos, seguida de una cola a 3' rica en adeninas (Schmid. 1998. *Nuc. Acid Res.* 26: 4541-50). Dado que aproximadamente un genoma humano haploide contiene 3×10^9 pares de bases, ¿cuántos pares de bases hay aproximadamente entre cada secuencia *Alu*?

22. A continuación se muestra un diagrama de la estructura general del cromosoma del bacteriófago λ. Especule sobre el mecanismo mediante el cual tras la infección de una célula huésped forma un anillo cerrado.

5′GGGCGGCGACCT—región de doble cadena—3′
3′—región de doble cadena—CCCGCCGCTGGA5′

23. Las secuencias de DNA repetidas en tándem que presentan una secuencia repetida de uno a seis pares de bases, como por ejemplo $(GACA)_n$, se denominan microsatélites, y son comunes en los eucariotas. Un grupo particular de ellas, las repeticiones de trinucleótidos, son especialmente interesantes dada la función que desempeñan en algunas enfermedades neurodegenerativas (la enfermedad de Huntington, la distrofia miotónica, la atrofia muscular espinal-bulbar, la ataxia espinocerebelar y el síndrome del X frágil). A continuación se muestran datos modificados obtenidos a partir del trabajo de Toth y sus colaboradores (2000. *Gen. Res.* 10: 967-81) sobre la localización de los microsatélites entre genes y dentro de los mismos. ¿Qué conclusión general puede extraer de estos datos?

Porcentaje de secuencias de DNA microsatélite dentro de los genes y entre ellos

Grupo taxonómico	Dentro de genes	Entre genes
Primates	7,4	92,6
Roedores	33,7	66,3
Artrópodos	46,7	53,3
Levaduras	77,0	23,0
Otros hongos	66,7	33,3

24. Información adicional a la suministrada en el Problema 23 proporcionó datos sobre el patrón de longitud de las repeticiones que se encuentran dentro de los genes. Cada valor de la siguiente tabla representa el número de veces que un microsatélite con una longitud de secuencia concreta, entre uno y seis pares de bases, se encuentra en los genes. Por ejemplo, en primates, una secuencia de dos nucleótidos (como GC) se encuentra 10 veces, y de tres nucleótidos 1.126 veces. En hongos, un motivo repetido de 6 nucleótidos (como GACACC) se encuentra 219 veces, mientras que una repetición de 4 nucleótidos (como GACA) se encuentra solo 2 veces. Analice e interprete estos datos indicando qué patrón general se hace evidente respecto a la distribución de las diversas longitudes de microsatélites dentro de los genes. ¿Qué significado puede tener este patrón general?

Distribución de microsatélites por unidad de longitud dentro de los genes

	Longitud del motivo repetido					
Grupo taxonómico	1	2	3	4	5	6
Primates	49	10	1126	29	57	244
Roedores	62	70	1557	63	116	620
Artrópodos	12	34	1566	0	21	591
Levaduras	36	19	706	7	52	330
Otros hongos	9	4	381	2	35	219

25. A pesar de la considerable importancia médica y biológica de las secuencias de DNA repetitivo, todavía se desconocen los factores que determinan su génesis y su distribución genómica. Se ha descrito que los mecanismos que causan variación en el número de repeticiones existentes son la mala alineación de las cadenas de DNA repetitivo y un resbalón de la DNA polimerasa. Hasta hace poco, había poca información sobre la generación inicial de una región genómica microsatélite. El 2001, Wilder y Hollocher (*Mol. Biol. Evol.* 18:384-92) secuenciaron el DNA que rodea numerosas regiones microsatélite de tetranucleótidos en diversas cepas de de dos especies de *Drosophila*, y observaron las secuencias que se muestran a continuación. (a) Identifique el motivo del tetranucleótido del microsatélite. ¿Es perfecto este motivo? Utilizando Pu para representar una purina y Py para representar una pirimidina, simbolice la repetición tetranucleotídica de manera parecida a $(CPuGPy)_n$. (b) ¿Cuál es la secuencia de la región no microsatélite? ¿Se conserva esta región perfectamente entre todas las especies y cepas enumeradas?

Especies (cepa)	Secuencia de bases
D. nigrodunni-1	5′-TCGATATAGCCATGTCCGTCTGTCCGTCTGT
D. nigrodunni-2	5′-TCGATATAGCCATGTCCGTCTGTCCGTCTGT
D. nigrodunni-3	5′-TCGATATAGCAATGTCCGTCTGTCCGTCTGT
D. dunni-1	5′-TCGATATAGCAATGTCCGTCTGTCCGTCTGT
D. dunni-2	5′-TCGATATAGCCATGTCCGTCTGTCCGTCTGT

26. Respecto a los hallazgos y al análisis que ha hecho en el Problema 25, ¿qué significado podría tener que las regiones no microsatélite que flanquean un tipo específico de microsatélites estén conservadas?

27. Actualmente los microsatélites se usan en pruebas de paternidad. A continuación se muestra un ejemplo de prueba de paternidad, en la que se utilizaron diez marcadores microsatélite para analizar muestras de la madre, de su hijo y del supuesto padre. En la columna de la izquierda se muestra el nombre del locus del microsatélite, y el genotipo de cada individuo viene dado por el número de repeticiones que él o ella tiene en cada locus. Por ejemplo, en el locus D9S302 la madre tiene 30 repeticiones en un cromosoma y 31 en el otro. En los casos en que una persona tiene el mismo número de repeticiones en ambos cromosomas, solo se muestra un valor. (Algunos de los valores presentan decimales, p.e. 20,2, por incluir repeticiones parciales además de las completas.) Suponiendo que estos marcadores presentan un patrón de herencia mendeliano simple, ¿se puede excluir al supuesto padre como fuente del esperma que produjo al hijo? ¿Por qué o por qué no? Explíquelo.

Locus del microsatélite-localización cromosómica	Madre	Hijo	Supuesto padre
D9S302-9q31-q33	30	31	32
	31	32	33
D22S883-22pter-22qter	17	20,2	20,2
	22	22	
D18S535-18q12.2-q12.3	12	13	11
	14	14	13
D7SI 804-7pter-7qter	27	26	26
	30	30	27
D3S2387-3p24.2.3pter	23	24	20,2
	25,2	25,2	24
D4S2386-4pter-qter	12	12	12
			16
D5S1719-5pter-5qter	11	10,3	10
	11,3	11	10,3
CSF1PO-5q33.3.q34	11	11	10
		12	12
FESFPS-15q25-15qter	11	12	10
	12	13	13
TH01-11p15.5	7	7	7
			8

28. Recuerde del Capítulo 10 (Figura 10.20) que cuando se calienta DNA de doble cadena, la densidad óptica se incrementa como consecuencia de la desnaturalización de la hélice y la separación de las cadenas. ¿Cómo puede utilizarse esta técnica para caracterizar los distintos componentes y secuencias del genoma eucariótico?

29. Si se analiza DNA de *Drosophila melanogaster* utilizando la centrifugación por gradiente de densidad y encuentra que contiene un pico «satélite» diferente a la banda principal de DNA, describa un conjunto de experimentos para determinar todo lo que pueda sobre la naturaleza de este DNA en comparación con la banda de DNA principal.

30. En el extremo del brazo corto del cromosoma 16 humano (16p) se encuentran diversos genes asociados a enfermedades, incluyendo la talasemia y la enfermedad del riñón policístico. Cuando se secuencia esta región del cromosoma 16 se ve que las regiones codificantes están muy cerca de las secuencias asociadas al telómero. ¿Puede haber alguna relación entre la localización de estos genes y la presencia de las secuencias asociadas al telómero? Qué información adicional respecto a estos genes puede ser útil para su análisis?

LECTURAS SELECCIONADAS

Angelier, N., et al. 1984. Scanning electron microscopy of amphibian lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 89:243–53.

Bauer, W.R., Crick, F.H.C., and White, J.H. 1980. Supercoiled DNA. *Sci. Am.* (July) 243:118–33.

Beerman, W., and Clever, U. 1964. Chromosome puffs. *Sci. Am.* (Apr.) 210:50–58.

Carbon, J. 1984. Yeast centromeres: Structure and function. *Cell* 37:352–53.

Chen, T.R., and Ruddle, F.H. 1971. Karyotype analysis utilizing differential stained constitutive heterochromatin of human and murine chromosomes. *Chromosoma* 34:51–72.

Corneo, G., et al. 1968. Isolation and characterization of mouse and guinea pig satellite DNA. *Biochemistry* 7:4373–79.

DuPraw, E.J. 1970. *DNA and chromosomes*. New York: Holt, Rinehart & Winston.

Gall, J.G. 1981. Chromosome structure and the *C*-value paradox. *J. Cell Biol.* 91:3s–14s.

Hewish, D.R., and Burgoyne, L. 1973. Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52:504–10.

Korenberg, J.R. and Rykowski, M.C. 1988. Human genome organization: *Alu*, LINES, and the molecular organization of metaphase chromosome bands. *Cell* 53:391–400.

Kornberg, R.D. 1975. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868–71.

Kornberg, R.D., and Klug, A. 1981. The nucleosome. *Sci. Am.* (Feb.) 244:52–64.

Lorch, Y., Zhang, N, and Kornberg, R.D. 1999. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*. 96:389–92.

Luger, K., et al. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 resolution. *Nature* 389:251–56.

Moyzis, R.K. 1991. The human telomere. *Sci. Am.* (Aug.) 265:48–55.

Olins, A.L., and Olins, D.E. 1974. Spheroid chromatin units (*n* bodies). *Science* 183:330–32.

——— 1978. Nucleosomes: The structural quantum in chromosomes. *Am. Sci.* 66:704–11.

Singer, M.F. 1982. SINES and LINES: Highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28:433–34.

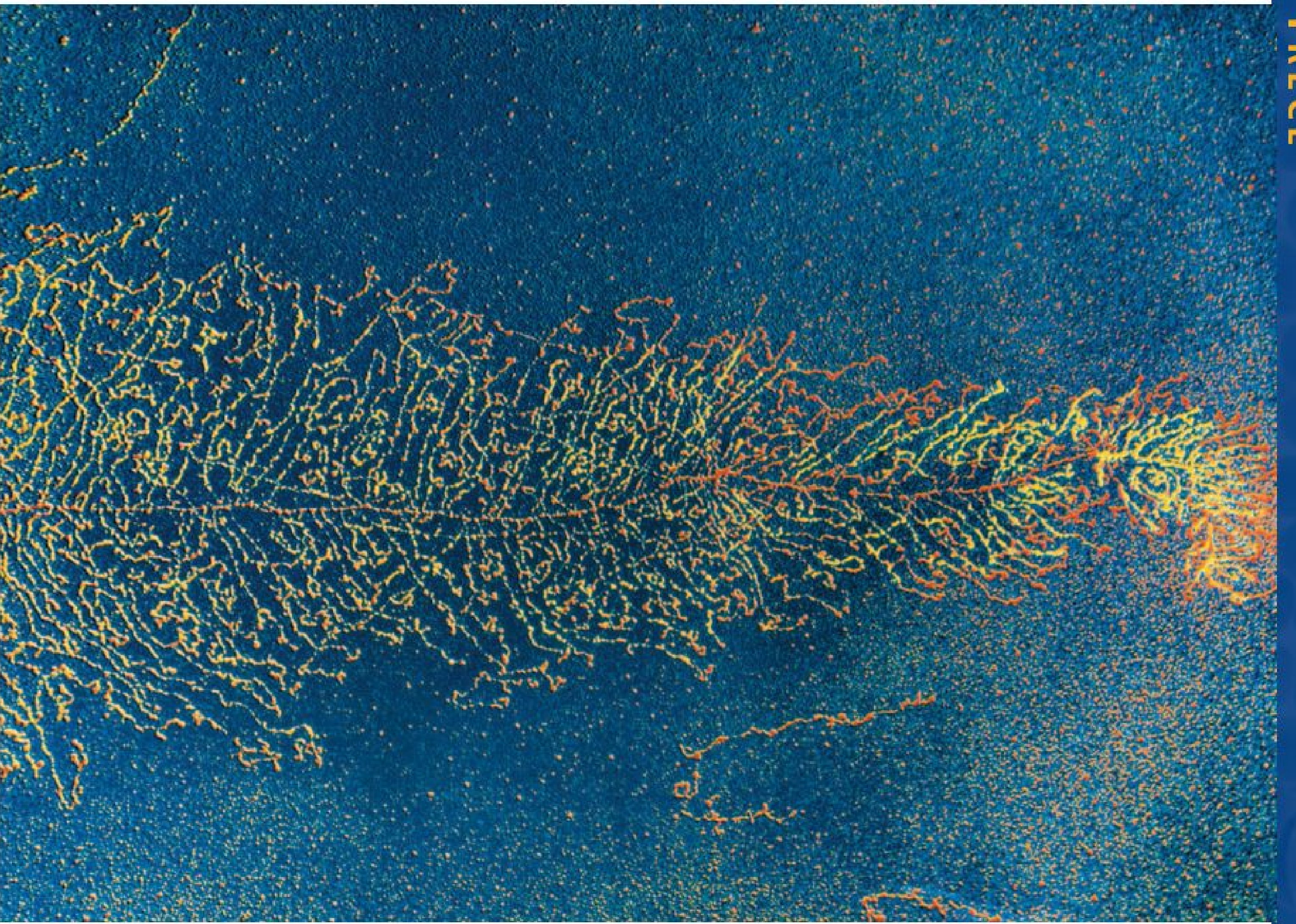
Wolfe, A. 1998. *Chromatin: Structure and Function*. 3rd ed. San Diego: Academic Press.

Yunis, J.J., 1976. High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268–70.

Yunis, J.J., and Prakash, O. 1982. The origin of man: A chromosomal pictorial legacy. *Science* 215:1525–30.

El código genético y la transcripción

Capítulo Trece



Micrografía electrónica que muestra el proceso de transcripción.

Conceptos del capítulo

- La información genética se almacena en el DNA utilizando un código de tripletes, y es casi universal para todos los seres vivos de la Tierra.
- El código genético se transfiere inicialmente del DNA al RNA durante el proceso de transcripción.
- Una vez transferido al RNA, el código genético se presenta en codones de tripletes, en los que se utilizan los cuatro ribonucleótidos del RNA como las letras para componerlos.
- Usando cuatro letras tomadas de tres en tres, las 64 secuencias de tripletes pueden codificar los 20 aminoácidos presentes en las proteínas, que son el producto final de la mayor parte de genes.
- Diversos codones proporcionan señales de iniciación y terminación de la síntesis proteica.
- El proceso de transcripción es similar en los eucariotas y en los procariotas y los bacteriófagos que los infectan, aunque es más complejo en los eucariotas.

Como vimos en el Capítulo 10, la estructura del DNA consiste en una secuencia lineal de desoxirribonucleótidos. En última instancia, esta secuencia dicta los componentes que forman las proteínas, el producto final de la mayor parte de los genes. Una cuestión central es cómo se puede descodificar en una proteína una información almacenada en forma de ácido nucleico. La Figura 13.1 proporciona un resumen simplificado de cómo se produce esta transferencia de información. En el primer paso de la expresión génica, la información que se encuentra en una de las dos cadenas de DNA se transfiere a una secuencia complementaria de RNA mediante el proceso de transcripción. Una vez sintetizado, este RNA actúa de «molécula mensajera» que lleva la información codificada. De ahí su nombre, **RNA mensajero (mRNA)**. Estos RNAs se asocian con los ribosomas, en los que se produce la descodificación en proteínas.

En este capítulo nos centraremos en la fase inicial de la expresión génica dando respuesta a dos preguntas importantes. En primer lugar, ¿cómo está codificada la información genética? Segundo, ¿cómo se produce la transferencia del DNA al RNA, definiendo así el proceso de transcripción? Como veremos, investigaciones analíticas ingeniosas establecieron que el código genético está escrito en unidades de tres letras, los ribonucleótidos presentes en el RNA, que son el reflejo de la información almacenada en los genes. Cada palabra escrita en un código de tripletes dirige la incorporación de un aminoácido específico durante la síntesis de una proteína. Como puede predecirse basándose en la discusión anterior sobre la replicación del DNA, la transcripción es también un proceso complejo que depende de una enzima polimerasa principal y de una colección de proteínas de soporte. Exploraremos lo que se sabe sobre la transcripción en bacterias, y después compararemos este modelo procariótico con los eucariotas.

En el Capítulo 14 continuaremos la discusión de la expresión génica preguntándonos cómo se produce la traducción, y después trataremos la estructura y la función de las proteínas. En conjunto, la información de estos dos capítulos proporciona una imagen detallada de la genética molecular, que sirve de fundamento básico para entender los organismos vivos.

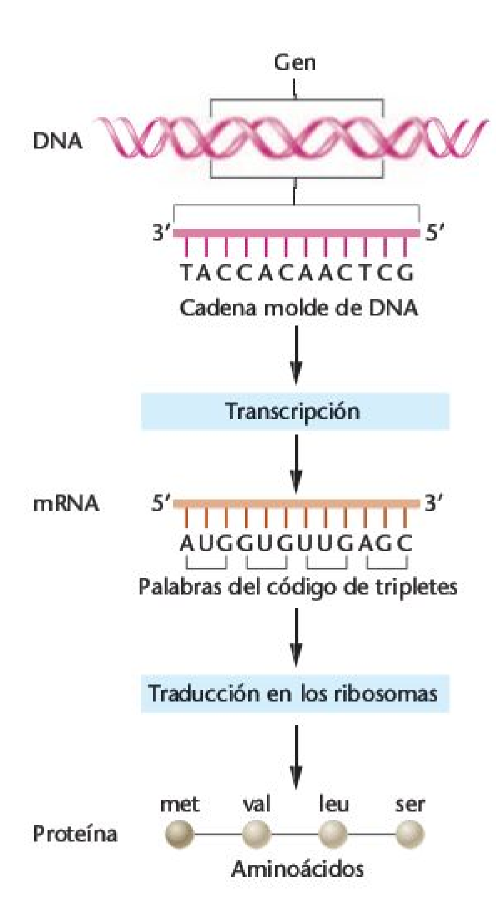


FIGURA 13.1 Flujo de la información genética codificada en el DNA a RNA mensajero y a proteína.

Seminario Web 13.1
Transcripción

13.1 El código genético presenta una serie de características

Antes de considerar los diversos enfoques analíticos al conocimiento actual del código genético, resumamos las características generales que lo caracterizan:

1. El código genético está escrito de manera lineal utilizando como «letras» las bases ribonucleotídicas que componen las moléculas de mRNA. La secuencia ribonucleotídica proviene de las bases nucleotídicas complementarias del DNA.
2. Cada «palabra» del mRNA contiene tres letras ribonucleotídicas. Denominados **codones**, cada grupo de *tres* ribonucleótidos especifica *un* aminoácido.
3. El código **no contiene ambigüedades**, en el sentido de que cada triplete especifica sólo un único aminoácido.
4. El código es **degenerado**, en el sentido en que un determinado aminoácido puede ser especificado por más de un codón. Es así para 18 de los 20 aminoácidos.
5. El código contiene señales de «inicio» y «fin», unos codones determinados que son necesarios para **iniciar** y **terminar** la transcripción.
6. El código no utiliza ninguna puntuación interna («comas»). Así, se dice que el código **no tiene comas**. Una vez empieza la traducción del mRNA, los tripletes se leen por orden y sin ninguna interrupción.
7. El código **no es solapado**. Una vez empieza la transcripción, cada ribonucleótido, en una posición específica en el mRNA, forma parte de un único codón.
8. El código es casi **universal.** Salvo pequeñas excepciones, casi todos los virus, procariotas, arqueas y eucariotas usan un solo diccionario codificante.

13.2 Los estudios iniciales establecieron los patrones funcionales básicos del código

A finales de la década de 1950, antes de que quedase claro que el mRNA sirve de intermediario transfiriendo información genética del DNA a las proteínas, se pensaba que el DNA podía participar directamente en la síntesis de proteínas. Puesto que los ribosomas ya habían sido identificados, la creencia inicial era que el DNA de un gen se asociaba de alguna manera con los ribosomas, en los que durante la síntesis de proteínas se descodificaba la información almacenada. En los modelos más iniciales, que se encaraban a la pregunta de cómo 4 nucleótidos podían codificar 20 aminoácidos, abrazaban la idea que el código de DNA sería solapado. Es decir, que cada nucleótido formaría parte de más de una palabra codificante contigua. Este concepto fue pronto inaceptable, puesto que se acumularon pruebas que demostraban incongruencias como resultado de las restricciones que un modelo de código solapado pondría en la secuencia aminoacídica resultante. En breve trataremos algunas de estas pruebas. Además, cada vez había más pruebas de que el RNA podría estar implicado en este proceso. En 1961, François Jacob y Jacques Monod postularon la existencia del **RNA mensajero (mRNA)**. Una vez se descubrió el mRNA, quedó claro que, aunque la información genética se almacena en el DNA, el código que se transcribe a proteínas reside en el RNA. Entonces la pregunta central fue cómo únicamente cuatro letras, los cuatro nucleótidos, podían especificar 20 palabras, los aminoácidos.

La naturaleza de tripletes del código

Al principio de la década de los 60 Sidney Brenner razonó sobre fundamentos teóricos, que el código debía estar formado por tripletes, ya que palabras de tres letras representaban la combinación mínima de cuatro letras para especificar 20 aminoácidos. Por ejemplo, cuatro nucleótidos tomados de dos en dos proporcionarían sólo 16 palabras codificadas diferentes (4^2). Un código de tripletes proporcionaría 64 palabras (4^3), evidentemente más de las 20 necesarias, y sería mucho más simple que un código de cuatro letras, que especificaría 256 palabras (4^4).

El ingenioso trabajo experimental de Francis Crick, Leslie Barnett, Brenner y R. J. Watts-Tobin representó la primera prueba convincente de la característica de triplete del código. Estos investigadores indujeron mutaciones por inserción y deleción en el locus *rII* del fago T4 (véase el Capítulo 6). Las mutaciones de este locus causan una lisis rápida y calvas identificables. Estos mutantes infectan con éxito a la cepa B de *E. coli*, pero no pueden reproducirse en otra cepa distinta denominada K12. Crick y sus colaboradores usaron el colorante de acridina proflavina para inducir mutaciones. Este agente mutagénico se intercala entre la doble hélice de DNA, causando a menudo durante la replicación la inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Como se muestra en la Figura 13.2(a), una inserción de un único nucleótido provoca un cambio en la fase de lectura, cambiando la secuencia específica de todos los tripletes posteriores a la derecha de la inserción. Estas mutaciones se denominan de **cambio de fase** (o de **cambio de pauta de lectura**). Con respecto a la traducción, se alterará la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Cuando estas mutaciones se presentan en el locus *rII*, T4 no se reproduce en *E. coli* K12.

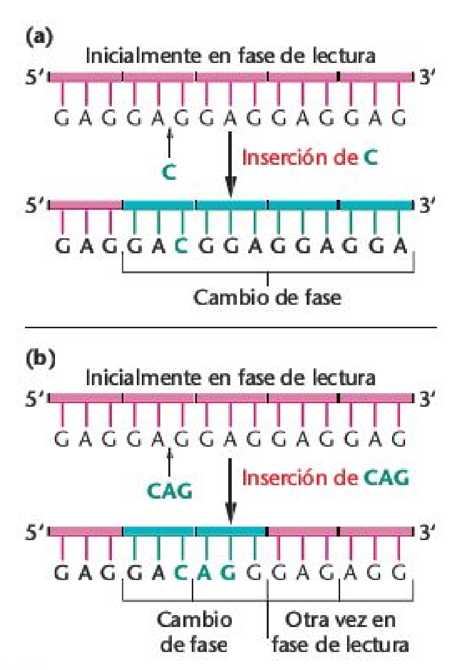


FIGURA 13.2 Esquema de los efectos de las mutaciones de cambio de fase en la secuencia de un DNA formado por el triplete repetido GAG. (a) La inserción de un nucleótido cambia la fase de lectura de todos los tripletes posteriores. (b) La inserción de tres nucleótidos cambia sólo dos codones, pero la fase de lectura se reestablece como en la secuencia original.

Crick y sus colaboradores razonaron que si un fago con estas mutaciones inducidas se trataba otra vez con proflavina, se produciría otra inserción o deleción. Un segundo cambio podría dar por resultado un fago revertiente, que se comportaría como silvestre e infectaría con éxito a *E. coli* K12. Por ejemplo, si el mutante original contenía una inserción (+), un segundo suceso que causase una deleción (−) cercana a la inserción restauraría la fase de lectura original. Así mismo, un suceso que produjera una inserción (+) podría corregir una deleción (−) original.

Al estudiar muchas mutaciones de este tipo, estos investigadores pudieron comparar diversas combinaciones de mutantes en la misma secuencia de DNA. Encontraron que diferentes combinaciones de una (+) y una (−) causaban ciertamente la reversión al comportamiento silvestre. Otras observaciones aclararon el número de nucleótidos que forman el código genético. Cuando dos (+) o dos (−) estaban juntas, *no se restablecía* la pauta correcta de lectura. Esto era un argumento en contra del código de dos letras (doblete). Sin embargo, cuando

tres (+) [Figura 13.2(b)] o tres (−) se presentaban juntas, *se restablecía* la pauta original. Estas observaciones apoyaban firmemente la característica de triplete del código.

La naturaleza no solapante del código

El trabajo de Sydney Brenner y de sus colaboradores pronto estableció que el código no era solapado. Por ejemplo, suponiendo un código de tripletes, Brenner consideró las restricciones que debería tener si fuese solapado. Consideró secuencias teóricas de nucleótidos que codificasen una proteína de tres aminoácidos. Por ejemplo, en la secuencia nucleotídica GTACA, la parte del codón central, TAC, está compartida por los codones exteriores, GTA y ACA. Brenner razonó que si fuese así, sólo se podrían encontrar determinados aminoácidos adyacentes al codificado por el triplete central, lo que le permitió concluir que si el código fuese solapado, las secuencias de tripéptidos en las proteínas deberían ser limitadas.

Por ejemplo, cuando se considera un determinado aminoácido central, sólo hay 16 combinaciones (2^4) de secuencias aminoacídicas (un tripéptido) teóricamente posibles. Buscando en las secuencias aminoacídicas disponibles que habían sido estudiadas, no encontró dichas restricciones en las secuencias de tripéptidos. Para cada aminoácido central, encontró muchos más de 16 tripéptidos diferentes. Esta observación le permitió concluir que el código no es solapado.

Un segundo argumento importante en contra del código solapado se refería al efecto de un solo cambio nucleotídico característico de una mutación puntual. En un código solapado, una mutación puntual afectaría a dos aminoácidos adyacentes. Sin embargo, mutaciones en los genes que codifican la proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco (TMV), la hemoglobina humana y la enzima bacteriana triptófano sintetasa mostraban invariablemente cambios en un solo aminoácido.

El tercer argumento en contra del código solapado lo presentó Francis Crick en 1957, cuando predijo que el DNA no sirve de molde directo para la formación de proteínas. Crick razonó que cualquier afinidad entre nucleótidos y aminoácidos requeriría puentes de hidrógeno. Químicamente, sin embargo, tales afinidades específicas parecían improbables. En cambio, Crick propuso que debería existir una **molécula adaptadora** que pudiese unirse covalentemente al aminoácido y que pudiese también formar puentes de hidrógeno con la secuencia nucleotídica. Puesto que, durante la traducción, diversos adaptadores tendrían que solaparse unos con otros de alguna manera sobre los nucleótidos, Crick razonó que las restricciones físicas harían el proceso demasiado complejo y, quizás, incluso ineficiente durante la traducción. Como veremos posteriormente en este capítulo, la predicción de Crick era correcta; el RNA transferente (tRNA) sirve de adaptador en la síntesis proteica, y durante la traducción el ribosoma aloja dos moléculas de tRNA a la vez.

En conjunto, los argumentos de Crick y Brenner sugerían firmemente que durante la traducción, el código genético **no es solapado**. Sin excepción, este concepto se ha confirmado.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cual fue la base para que los genéticos creyesen que el código genético era de tripletes no solapados incluso antes de disponer de pruebas experimentales directas?

La naturaleza sin puntuaciones y degenerada del código

Entre 1958 y 1960 se continuó acumulando información sobre el código genético. Además de la propuesta del adaptador, Crick hipotetizó, basándose en pruebas genéticas, que el código **no tiene comas**; es decir, creía que no había signos de puntuación internos en la fase de lectura[1]. Crick también especuló con que sólo 20 de los 64 tripletes posibles especificaban un aminoácido y que los 44 restantes no tenían ningún código asignado.

¿Se equivocó Crick con respecto a los 44 codones «en blanco»? Es decir, ¿el código es **degenerado**, lo que significa que más de un codón especifica un mismo aminoácido? Los estudios de cambio de fase de lectura de Crick sugirieron que, contrariamente a su propuesta inicial, el código es degenerado. En los casos en que se restablece la función silvestre, es decir (+) y (−), (++) y (−−), y (+++) y (−−−), se recupera la fase de lectura original. Sin embargo, entre las diversas adiciones y deleciones debería haber numerosos tripletes que estarían fuera de la pauta. Si 44 de los 64 posibles tripletes estuviesen en blanco y no especificasen ningún aminoácido, probablemente se habría producido uno de estos tripletes (denominados **tripletes sin sentido**) en el trecho de nucleótidos todavía fuera de la pauta. Se razonó que si se encontrase un codón sin sentido durante la síntesis proteica, el proceso se pararía o se terminaría en ese punto. Si fuese así, no se produciría el producto del locus *rII* y no se produciría el restablecimiento de la fase de lectura. Ya que las diversas combinaciones mutantes podían reproducirse en *E. coli* K12, Crick y sus colaboradores concluyeron que, con toda probabilidad, la mayoría si no todos los restantes 44 codones no estaban en blanco. Por lo tanto el código genético es **degenerado**. Como veremos, este razonamiento demostró ser correcto.

13.3 Los trabajos de Nirenberg, Matthaei y de otros investigadores condujeron al desciframiento del código

En 1961, Marshall Nirenberg y J. Heinrich Matthaei caracterizaron las primeras secuencias específicas codificantes, que sir-

[1] *Nota del traductor:* para referirse al trecho de tripletes que son traducidos a proteína, se utilizan las expresiones *fase de lectura, pauta de lectura,* o *marco de lectura* indistintamente, siendo todas ellas sinónimas.

vieron de piedra angular para el análisis completo del código genético. Su éxito, así como el de otros investigadores que también hicieron importantes contribuciones al desciframiento del código genético, estribó en la utilización de dos herramientas experimentales: un **sistema de síntesis proteica *in vitro* (exento de células)**, y la enzima **polinucleótido fosforilasa**, que permite la producción de mRNA sintéticos. Estos mRNA sirvieron de molde para la síntesis de polipéptidos por el sistema exento de células.

Síntesis de polipéptidos en un sistema exento de células

En el sistema exento de células, los aminoácidos pueden incorporarse en cadenas polipeptídicas. Esta mezcla utilizada *in vitro*, como podría esperarse, debe contener los factores necesarios para la síntesis proteica en la célula: ribosomas, tRNA, aminoácidos y otras moléculas esenciales para la traducción. Para seguir (o rastrear) la síntesis proteica, uno o más aminoácidos deben ser radioactivos. Finalmente, debe añadirse un mRNA que sirva de molde a traducir.

En 1961, todavía no podía aislarse mRNA. Sin embargo, la utilización de la enzima polinucleótido fosforilasa permitía la síntesis artificial de moldes de RNA, que podían añadirse al sistema exento de células. Esta enzima, aislada de bacterias, cataliza la reacción que se muestra en la Figura 13.3. Descubierta en 1955 por Marianne Grunberg-Manago y Severo Ochoa, la función metabólica de la enzima en células bacterianas es degradar RNA. Sin embargo, *in vitro*, con altas concentraciones de ribonucleósidos difosfato, la reacción puede «forzarse» en la dirección opuesta para sintetizar RNA, como se muestra en la figura. Al contrario que la RNA polimerasa, la polinucleótido fosforilasa no precisa un molde de DNA. El resultado es que cada adición de un ribonucleótido es al azar, basado en la concentración relativa de los cuatro ribonucleósidos difosfato añadidos a la mezcla de reacción. La probabilidad de inserción de un ribonucleótido específico es proporcional a la disponibilidad de esa molécula, relativa a los otros ribonucleótidos disponibles. *Este punto es realmente importante para entender el trabajo de Niremberg y de otros científicos en la siguiente discusión.*

En conjunto, el sistema exento de células para la síntesis proteica y la disponibilidad de mRNA sintético proporcionó un medio para descifrar la composición ribonucleotídica de diversos tripletes que codifican aminoácidos específicos.

Los códigos de los homopolímeros

En sus experimentos iniciales, Niremberg y Matthaei sintetizaron **homopolímeros de RNA** formados por un único tipo de ribonucleótidos. Por lo tanto, el mRNA que se añadía al sistema *in vitro* era UUUUUU..., AAAAAA..., CCCCCC..., o GGGGGG.... Al probar cada mRNA, podían determinar qué aminoácido, si es que lo había, se había incorporado en las proteínas recién sintetizadas. Los investigadores lo determinaban marcando uno de los 20 aminoácidos añadidos al sistema *in vitro* y realizando una batería de experimentos, cada uno con un aminoácido radioactivo diferente.

Por ejemplo, examinemos uno de los experimentos en que se utilizó fenilalanina-^{14}C (Tabla 13.1). Niremberg y Matthaei concluyeron que el mensaje poli-U (ácido poliuridílico) dirige sólo la incorporación de fenilalaninas en el homopolímero polifenilalanina. Suponiendo un código de tripletes, habían determinado la primera asignación de un codón específico: UUU codifica fenilalanina. Del mismo modo, encontraron rápidamente que AAA codifica lisina y CCC codifica prolina. El poli-G no sirvió de molde adecuado, debido probablemente a que la molécula se dobla sobre sí misma.

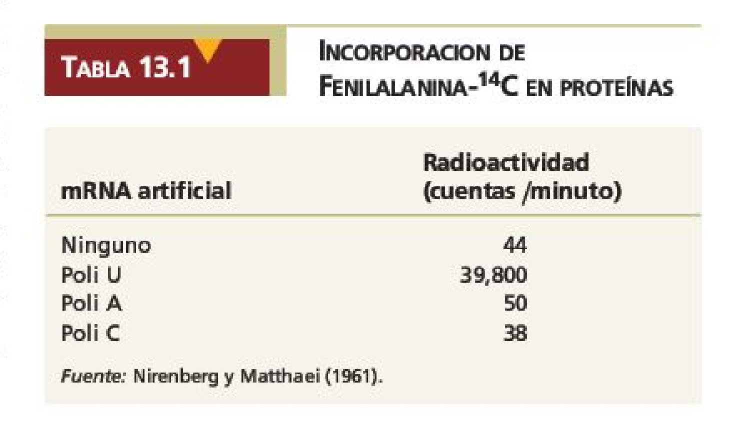


TABLA 13.1 INCORPORACION DE FENILALANINA-^{14}C EN PROTEÍNAS

mRNA artificial	Radioactividad (cuentas /minuto)
Ninguno	44
Poli U	39,800
Poli A	50
Poli C	38

Fuente: Nirenberg y Matthaei (1961).

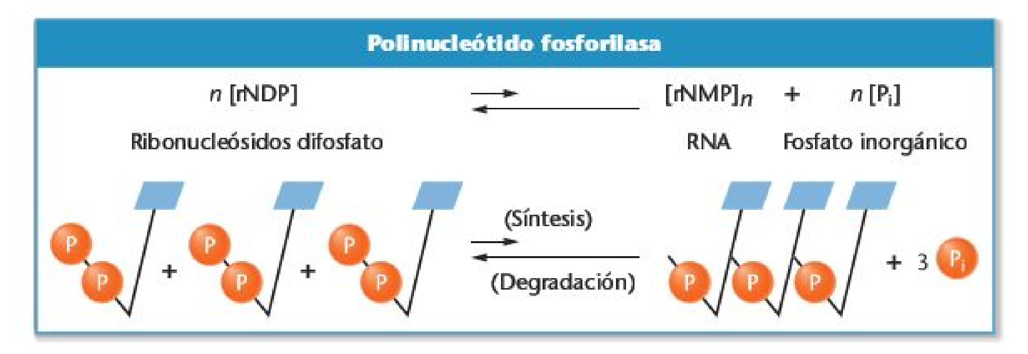


FIGURA 13.3 Reacción catalizada por la enzima polinucleótido fosforilasa. Obsérvese que el equilibrio de la reacción favorece la degradación del RNA, pero puede «forzarse» para que favorezca la síntesis

De este modo, la asignación de GGG tuvo que esperar a otros métodos.

Obsérvese que la asignación de un codón específico fue posible gracias al uso de homopolímeros. Este método proporciona sólo la composición de los tripletes, no su secuencia, pero puesto que tres U, tres C o tres A sólo pueden tener una posible secuencia (p e. UUU, CCC y AAA), se identificó el codón real.

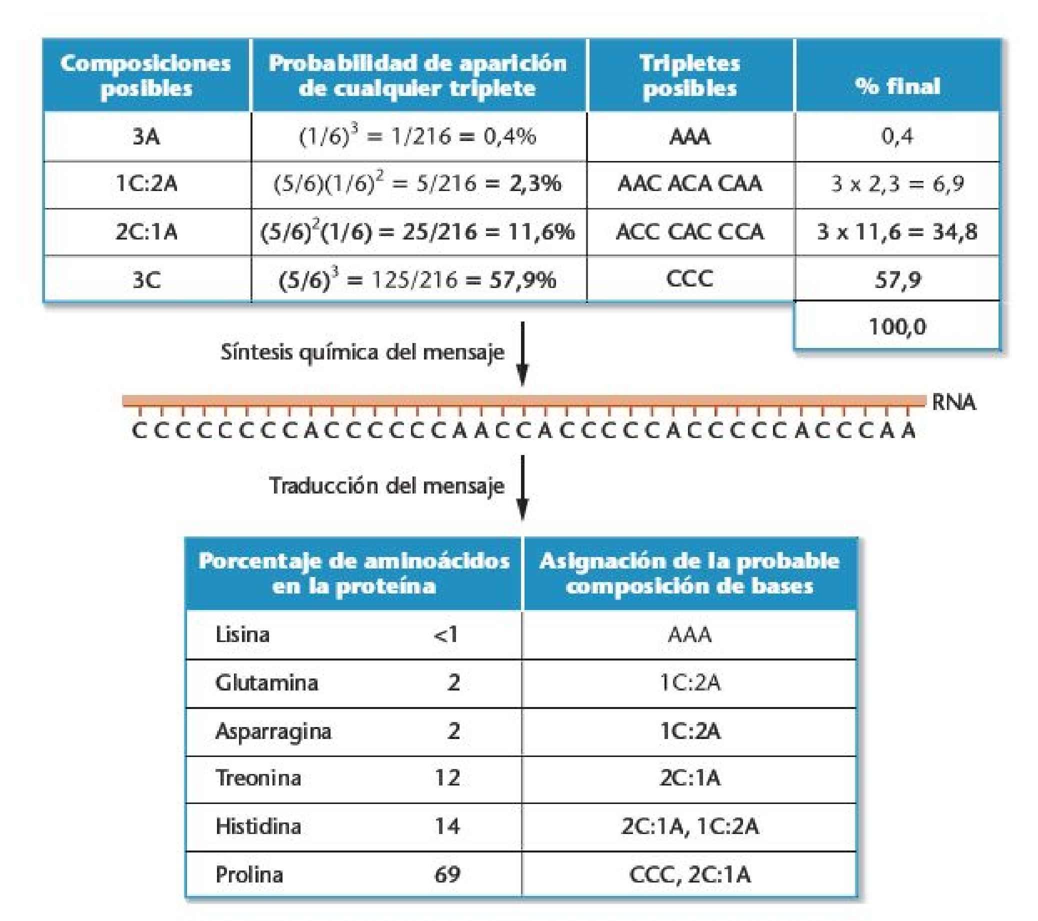
Mezcla de copolímeros

Con las técnicas disponibles, Niremberg y Matthaei y Ochoa y sus colaboradores recurrieron al uso de **heteropolímeros de RNA**. En esta técnica, se añade una combinación de dos o más ribonucleósidos difosfato diferentes para formar el mensaje. Estos investigadores razonaron que si se conoce la proporción relativa de cada tipo de ribonucleósido difosfato, se puede predecir la frecuencia con que se produce cada triplete particular en el RNA sintético. Si entonces se añade el mRNA al sistema exento de células y se determina el porcentaje de cada aminoácido concreto presente en la proteína recién sintetizada, se pueden hacer correlaciones y predecir las asignaciones de la composición.

Este enfoque se esquematiza en la Figura 13.4. Suponga que se añade A y C en una proporción de 1A:5C. Ahora, la inserción de un ribonucleótido en cualquier posición en la molécula de RNA durante su síntesis está determinada por la proporción de A:C. Por lo tanto, la probabilidad de ocupar cada posición es de 1/6 para una A y de 5/6 para una C. Sobre esta base, podemos calcular la frecuencia de aparición en el mensaje de cada codón dado.

Para AAA, la frecuencia es de $(1/6)^3$, o del 0,4 por ciento aproximadamente. Para AAC, ACA y CAA, la frecuencia es la misma, de $(1/6)^2$ (5/6), o de aproximadamente el 2,3 por ciento para cada uno. En conjunto, los tres codones 2A:1C justifican el 6,9 por ciento del total de secuencias de tres letras. Del mismo modo, cada uno de los tres codones 1A:2C justifican el $(1/6)(5/6)^2$, o el 11,6 por ciento (un total de 34,8 por ciento). CCC está representado por $(5/6)^3$, o el 57,9 por ciento de los codones.

Examinando los porcentajes de cualquier aminoácido dado incorporado en la proteína sintetizada bajo la dirección de este mensaje, se puede proponer la asignación probable a la composición de bases (Figura 13.4). Puesto que la prolina aparece el 69 por ciento de las veces, se podría proponer que la prolina está codificada por CCC (57,9 por ciento) y por un codón del



Composiciones posibles	Probabilidad de aparición de cualquier triplete	Tripletes posibles	% final
3A	$(1/6)^3 = 1/216 = 0{,}4\%$	AAA	0,4
1C:2A	$(5/6)(1/6)^2 = 5/216 = 2{,}3\%$	AAC ACA CAA	3 x 2,3 = 6,9
2C:1A	$(5/6)^2(1/6) = 25/216 = 11{,}6\%$	ACC CAC CCA	3 x 11,6 = 34,8
3C	$(5/6)^3 = 125/216 = 57{,}9\%$	CCC	57,9
			100,0

Porcentaje de aminoácidos en la proteína		Asignación de la probable composición de bases
Lisina	<1	AAA
Glutamina	2	1C:2A
Asparragina	2	1C:2A
Treonina	12	2C:1A
Histidina	14	2C:1A, 1C:2A
Prolina	69	CCC, 2C:1A

FIGURA 13.4 Resultados e interpretación de un experimento de mezcla de copolímeros en el que se utiliza una relación 1A:5C (1/6A:5/6C).

tipo 2C:1A (11,6 por ciento). La histidina, en un 14 por ciento, probablemente está codificada por un codón 2C:1A (11,6 por ciento) y uno 1C:2A (2,3 por ciento). La treonina, en un 12 por ciento, seguramente está codificada sólo por un codón 2C:1A. La asparragina y la glutamina parecen estar codificadas por uno de los codones 1C:2A, y la lisina parece estar codificada por AAA.

Se realizaron muchos experimentos parecidos utilizando hasta los cuatro ribonucleótidos para sintetizar el mRNA. Aunque la determinación de la *composición* de las palabras del código de tripletes correspondiente a los 20 aminoácidos representó un avance muy importante, aún se desconocían las *secuencias específicas* de los tripletes. Su determinación tuvo que esperar otras metodologías.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué prueba experimental proporcionó las primeras ideas sobre la composición de los codones que codifican aminoácidos específicos?

Ahora resuelva esto

El Problema 13.24 de la página 380 le pide que analice un par de experimentos recíprocos de copolímeros mezclados, y que pediga la composición de los codones para los aminoácidos que codifican.

Sugerencia: El conjunto de datos generados en los experimentos recíprocos es esencial para resolver el problema puesto que el análisis de los datos iniciales le proporcionará más de una respuesta posible. Sin embargo, sólo hay una respuesta congruente con ambos grupos de datos.

La técnica de unión al triplete

No mucho tiempo después se desarrollaron técnicas más avanzadas. En 1964 Nirenberg y Philip Leder desarrollaron la **prueba de unión al triplete**, que condujo a la asignación específica de los tripletes. Esta técnica aprovechó las observaciones de que los ribosomas, cuando se les presenta una secuencia corta de tres ribonucleótidos, se unen a ella y forman un complejo parecido al que se encuentra *in vivo*. El triplete actúa como un codón en el mRNA y atrae la secuencia complementaria del tRNA (Figura 13.5). Esta secuencia de triplete en el tRNA, que es complementaria al codón del mRNA, se denomina **anticodón**.

Aunque todavía no era factible sintetizar químicamente cadenas largas de RNA, en el laboratorio se podían sintetizar tripletes de secuencia conocida que sirviesen de molde.

Todo lo que se necesitaba era un método para determinar qué tRNA-aminoácido se unía al complejo triplete de RNA-ribosoma. El sistema de ensayo ideado era simple. Se hacía radioactivo al aminoácido que se quería probar, y se producía un tRNA cargado. Puesto que se conocían las composiciones de los codones, se podía concretar la decisión sobre qué aminoácidos se debían ensayar para cada triplete específico.

Se incuban conjuntamente el tRNA cargado radioactivo, el triplete de RNA, y los ribosomas en un filtro de nitrocelulosa, que retiene a los ribosomas pero no a los otros componentes más pequeños, como el tRNA cargado. Si la radioactividad no queda retenida en el filtro, es que se ha probado un aminoácido incorrecto. Si la radioactividad queda retenida en el filtro, es porque el tRNA cargado se ha unido al triplete asociado al ribosoma. En este caso, se puede asignar a un codón específico.

El trabajo se desarrolló en diversos laboratorios, y en muchos casos se obtuvieron resultados claros e inequívocos. Por ejemplo, la Tabla 13.2 muestra 26 tripletes asignados a 9 aminoácidos. Sin embargo, en algunos casos el nivel de unión no bastó, y no fue posible hacer la asignación. Con el tiempo, se asignaron 50 de los 64 tripletes. Estas asigna-

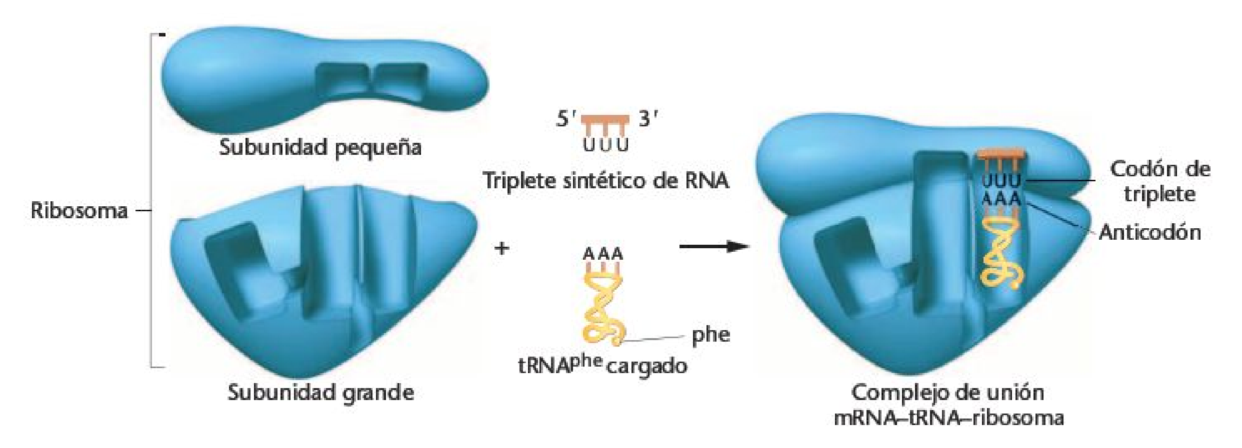


FIGURA 13.5 Ejemplo de un ensayo de unión al triplete. El triplete UUU actúa de codón, atrayendo el anticodón complementario AAA del $tRNA^{phe}$.

TABLA 13.2 **ASIGNACIÓN DE AMINOÁCIDOS A TRINUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DERIVADOS DE UNA PRUEBA DE UNIÓN AL TRIPLETE**

Trinucleótido	Aminoácido
UGU UGC	Cisteína
GAA GAG	Ácido glutámico
AUU AUG AUA	Isoleucina
UUA UUG CUU	Leucina
CUC CUA CUG	Leucina
AAA AAG	Lisina
AUG	Metionina
UUU UUC	Fenilalanina
CCU CCC CCG CCA	Prolina
UCU UCC UCA UCG	Serina

ciones específicas entre codones y aminoácidos permitieron extraer dos conclusiones importantes. En primer lugar, el código genético es degenerado; es decir, más de un codón puede especificar un mismo aminoácido. Segundo, el código no es ambiguo; es decir, un mismo codón especifica un único aminoácido. Como veremos después en este mismo capítulo, y salvo algunas excepciones poco significativas, estas conclusiones se han confirmado. La técnica de unión al triplete fue una innovación importante para descifrar el código genético.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se determinaron experimentalmente las secuencias específicas del código de tripletes?

Copolímeros repetidos

Para descifrar el código genético también se utilizó otra técnica innovadora desarrollada por Gobind Khorana a principios de la década de 1969, que permitía sintetizar químicamente largas moléculas de RNA que consistían en cortas secuencias repetidas muchas veces. Primero, creaba secuencias cortas (p. e. di-tri- y tetranucleótidos), que replicaba muchas veces y que finalmente unía enzimáticamente para formar polinucleótidos más largos. Como se esquematiza en la Figura 13.6, un dinucleótido hecho de esta manera se convierte en un mensaje con dos codones que se repiten. Un trinucleótido se convierte en un mensaje con tres codones potenciales, en función de donde se produzca la iniciación, y un tetranucleótido produce cuatro tripletes que se repiten.

Cuando este mRNA sintético se añadía a un sistema exento de células, se confirmaba el número de aminoácidos incorporados predicho. En la Tabla 13.3 se muestran varios ejemplos. Cuando se combinaban estos datos con conclusiones extraídas de los enfoques de asignación de la composición y de unión a tripletes, se podían hacer asignaciones específicas.

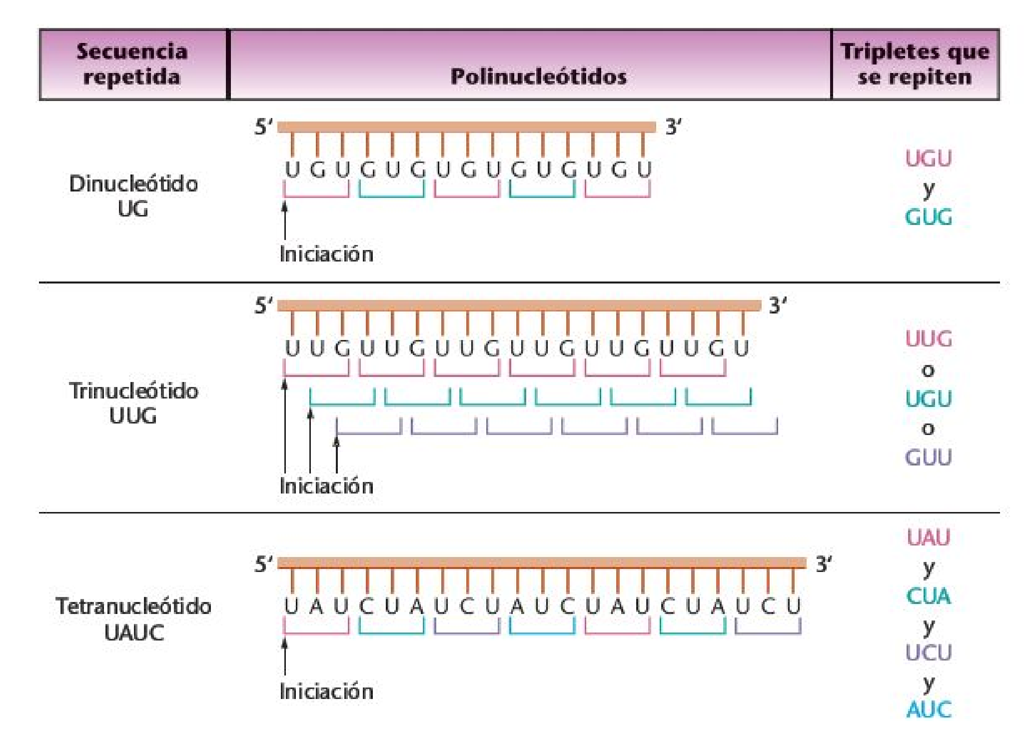


FIGURA 13.6 Conversión de di-, tri- y tetranucleótidos en copolímeros repetidos. Se muestran los codones de tripletes producidos en cada caso.

TABLA 13.3 **AMINOÁCIDOS INCORPORADOS UTILIZANDO COPOLÍMEROS SINTÉTICOS REPETIDOS DE RNA**

Copolímero repetido	Codones producidos	Aminoácidos en el polipéptido
UG	UGU	Cisteína
	GUG	Valina
AC	ACA	Treonina
	CAC	Histidina
UUC	UUC	Fenilalanina
	UCU	Serina
	CUU	Leucina
AUC	AUC	Isoleucina
	UCA	Serina
	CAU	Histidina
UAUC	UAU	Tirosina
	CUA	Leucina
	UCU	Serina
	AUC	Isoleucina
GAUA	GAU	Ninguno
	AGA	Ninguno
	UAG	Ninguno
	AUA	Ninguno

Un ejemplo de las asignaciones específicas hechas con estos datos mostrará la importancia del enfoque de Khorana. Considere los tres experimentos siguientes relacionados entre sí. La secuencia de trinucleótidos repetidos UUCUUCUUC... produce tres posibles codones: UUC, UCU y CUU, en función del nucleótido en que se inicia la lectura. Cuando se pone en un sistema de traducción exento de células, se producen polipéptidos que contienen fenilalanina (phe), serina (ser) y leucina (leu). Por otro lado, la secuencia de dinucleótidos repetidos UCUCUCUC... produce los tripletes UCU y CUC, que incorporan leucina y serina en el polipéptido. La combinación de estos resultados indica que los codones UCU y CUC especifican leucina y serina, pero no qué codón especifica cuál aminoácido. Además se puede concluir que el triplete CUU *o* el UUC también codifican leucina *o* serina, mientras que el otro codifica fenilalanina.

Para deducir información más específica, podemos examinar los resultados obtenidos al utilizar la secuencia repetida del tetranucleótido UUAC, que produce los codones UUA, UAC, ACU y CUU. El codón CUU es uno de los dos en los que estamos interesados. Se incorporan tres aminoácidos: leucina, treonina y tirosina. Como CUU debe especificar serina o leucina, y ya que, de los dos, sólo aparece la leucina, podemos concluir que CUU especifica leucina.

Una vez establecido esto, lógicamente podemos determinar todas las restantes asignaciones específicas. De los dos pares de tripletes que quedan (UUC y UCU del primer experimento, y UCU y CUC del segundo experimento), cualquiera que sea el triplete común a ambos debe codificar serina. Así pues, UCU codifica serina. Por eliminación, se determina que UUC codifica fenilalanina y CUC leucina. Siguiendo esta lógica, en estos experimentos se ha asignado tres aminoácidos diferentes a cuatro tripletes específicos.

De estas interpretaciones, Khorana reafirmó tripletes que ya se habían descifrado y llenó los huecos que otros enfoques habían dejado. Por ejemplo, la utilización de dos secuencias de tetranucleótidos GAUA y GUAA, sugirió que al menos dos tripletes eran señales de terminación. Se extrajo esta conclusión ya que ninguna de estas secuencias dirigía la incorporación de aminoácidos en un polipéptido. Como no hay codones comunes a ambos mensajes, se predijo que cada secuencia repetida contenía al menos un triplete que terminaba la síntesis proteica. En la Tabla 13.3 se muestran los posibles codones de la secuencia del poli-(GAUA), de los que UAG, es un codón de terminación.

Ahora resuelva esto

El Problema 13.4 de la página 378 le pide que considere diversos resultados de experimentos de copolímeros repetidos.

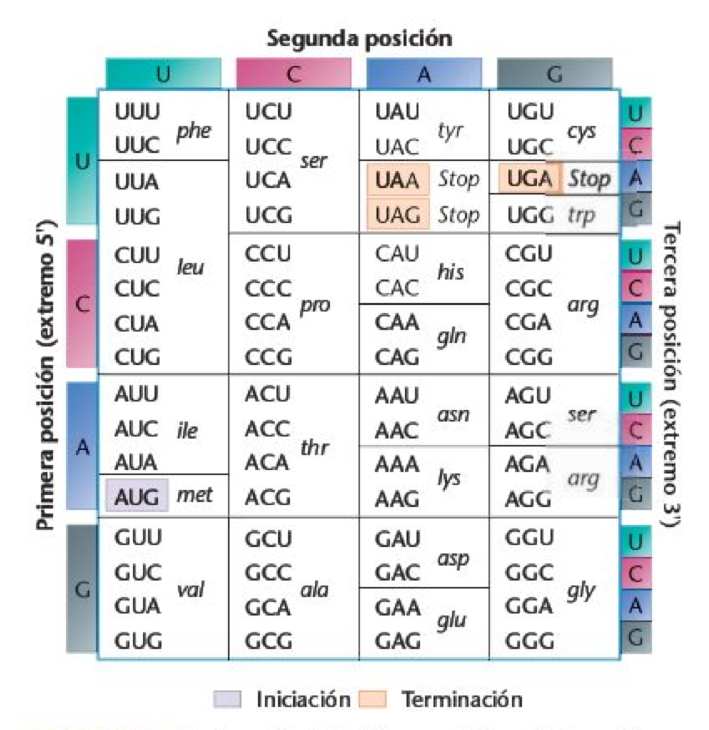
Sugerencia: En un copolímero repetido de RNA, la iniciación de la traducción se puede producir en cualquiera de los diversos ribonucleótidos. La clave para solucionar el problema es determinar el número de codones tripletes producidos por cada posible punto de iniciación.

13.4 El diccionario del código muestra diversos patrones interesantes entre los 64 codones

Las diversas técnicas utilizadas para descifrar el código genético han producido un diccionario con 61 asignaciones codón-aminoácido. Los tres tripletes restantes son señales de terminación, y no especifican ningún aminoácido. La Figura 13.7 indica las asignaciones según un modelo especialmente ilustrativo que fue sugerida por Francis Crick.

Degeneración y la hipótesis del tambaleo

Cuando se examina el diccionario del código genético se pone de manifiesto un patrón general de asignación de codones. Lo más evidente es que el código es **degenerado**, como predijeron los primeros investigadores. Es decir, la inmensa mayoría de aminoácidos está especificado por dos, tres, o cuatro codones diferentes. Tres aminoácidos (serina, arginina y leucina) están codificados por seis codones cada uno. Solo el triptófano y la metionina están codificados por un único codón.



Primera posición (extremo 5')	U	C	A	G	Tercera posición (extremo 3')
U	UUU phe	UCU ser	UAU tyr	UGU cys	U
U	UUC phe	UCC ser	UAC tyr	UGC cys	C
U	UUA leu	UCA ser	UAA Stop	UGA Stop	A
U	UUG leu	UCG ser	UAG Stop	UGG trp	G
C	CUU leu	CCU pro	CAU his	CGU arg	U
C	CUC leu	CCC pro	CAC his	CGC arg	C
C	CUA leu	CCA pro	CAA gln	CGA arg	A
C	CUG leu	CCG pro	CAG gln	CGG arg	G
A	AUU ile	ACU thr	AAU asn	AGU ser	U
A	AUC ile	ACC thr	AAC asn	AGC ser	C
A	AUA ile	ACA thr	AAA lys	AGA arg	A
A	AUG met	ACG thr	AAG lys	AGG arg	G
G	GUU val	GCU ala	GAU asp	GGU gly	U
G	GUC val	GCC ala	GAC asp	GGC gly	C
G	GUA val	GCA ala	GAA glu	GGA gly	A
G	GUG val	GCG ala	GAG glu	GGG gly	G

FIGURA 13.7 Diccionario del código genético. AUG codifica metionina, que inicia la mayoría de cadenas polipeptídicas. Todos los otros aminoácidos excepto el triptófano, que está codificado por UGG, están representados por dos a seis codones. Los codones UAA, UAG y UGA son señales de terminación y no codifican ningún aminoácido.

Lo que también es evidente es el patrón de degeneración. Muy a menudo, en un conjunto de codones que especifican un mismo aminoácido, las primeras dos letras son las mismas, y sólo difieren en la tercera. Por ejemplo, como se ve en la Figura 13.7, los codones para la fenilalanina (UUU y UUC, en la esquina superior izquierda de la tabla del código) sólo se diferencian en la tercera letra. Hay cuatro codones que especifican valina (GUU, GUC, GUA y GUG, en la esquina inferior izquierda), y también difieren sólo en la tercera letra. Crick observó este patrón de degeneración en todo el código, y en 1966 postuló la **hipótesis del tambaleo**. La hipótesis de Crick predice que los dos primeros ribonucleótidos del triplete son más importantes que el tercer miembro para atraer el tRNA correcto. Crick propuso que el puente de hidrógeno en la tercera posición de la interacción codón-anticodón estaría *menos* restringido, por lo que no necesita adherirse tan específicamente según las reglas de emparejamiento de bases.

En concreto, la hipótesis del tambaleo propone un conjunto de normas de emparejamiento de bases más flexible en la tercera posición del codón (Tabla 13.4). Esta modificación en las normas de emparejamiento de bases permite que el anticodón de un único tipo de tRNA se empareje con más de un triplete del mRNA . Como se indicó anteriormente, a menudo la degeneración del código permite una sustitución en la base de la tercera posición sin que cambie el aminoácido. De acuerdo con la hipótesis del tambaleo y la degeneración del código, una U en la primera posición (extremo 5′) del anticodón del tRNA puede emparejarse con una A o una G en la tercera posición (extremo 3′) del codón del mRNA, y una G puede emparejarse con una U o una C. La inosina, una de las bases modificadas que se encuentran en el tRNA, puede emparejarse con C, U y A. Aplicando estas reglas del tambaleo, se necesita un mínimo de 30 tipos diferentes de tRNA para proveer a los 61 tripletes que especifican un aminoácido. Si no hay más, el tambaleo se puede considerar como una potencial medida de economía, siempre y cuando no se comprometa la fidelidad de la traducción. Las estimaciones actuales son que hay 30-40 tipos de tRNA en bacterias y hasta 50 tipos de tRNA en células animales y vegetales.

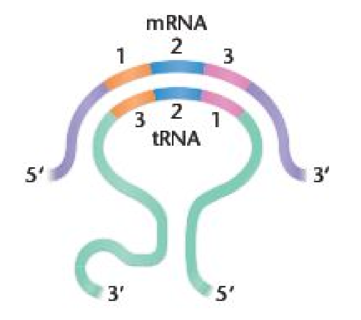
La naturaleza ordenada del código

Se ha puesto de manifiesto otra observación respecto al patrón de secuencias de los codones y sus correspondientes aminoácidos que ha conducido a la descripción de lo que se denomina **código genético ordenado**. A menudo, aminoácidos químicamente similares comparten una o dos bases en los diferentes tripletes que los codifican. Por ejemplo, una U o una C están presentes a menudo en la segunda posición de los tripletes que especifican aminoácidos hidrofóbicos, como la valina y la alanina, entre otros. Hay dos codones que especifican la lisina (AAA y AAG), un aminoácido cargado positivamente. Cambiando sólo la letra central de estos codones de A a G (AGA y AGG), se especifica la arginina, otro aminoácido también cargado positivamente. Los aminoácidos hidrofílicos, como la glicina o la treonina, están especificados muy a menudo por tripletes con una A o una C en la segunda posición.



TABLA 13.4 NORMAS DE EMPAREJAMIENTO DE BASES CODÓN-ANTICODÓN

Base de la primera posición (extremo 5') del tRNA	*Base de la tercera posición (extremo 3') del mRNA*
A	U
C	G
G	C o U
U	A o G
I	A, U, o C



Las propiedades químicas de los aminoácidos se tratarán más detalladamente en el Capítulo 14. El resultado final de la «ordenación» del código es que amortigua el efecto potencial de las mutaciones sobre la función de las proteínas. Mientras que muchas mutaciones en la segunda base del triplete producen el cambio de un aminoácido por otro, el cambio es a menudo por un aminoácido con propiedades químicas parecidas. En estos casos, la función de la proteína podría alterarse de manera imperceptible.

Iniciación, terminación y supresión

La iniciación de la síntesis proteica es un proceso altamente específico. En bacterias (en contraste con los experimentos *in vitro* tratados anteriormente), el aminoácido inicial que se inserta en todas la cadenas polipeptídicas es una forma modificada de la metionina —la **N-formilmetionina (fmet)**. Un único codón, AUG, codifica la metionina, y a veces se le denomina **codón de iniciación**. Sin embargo, cuando AUG está en el interior de un mRNA, se inserta metionina no formilada en la cadena polipeptídica. Raramente, otro triplete, GUG, especifica metionina durante la iniciación, aunque no está claro por qué sucede, ya que GUG codifica usualmente valina.

En bacterias, cuando se ha completado la síntesis de la proteína el grupo formil se elimina de la metionina inicial, o bien se elimina completamente el residuo formilmetionina. En eucariotas, el aminoácido inicial durante la síntesis polipeptídica es la metionina no formilada.

Como se citó en la sección anterior, otros tres tripletes (UAG, UAA y UGA)[2] sirven de **codón de terminación**, siendo señales de puntuación que no codifican ningún aminoácido. No son reconocidos por ninguna molécula de tRNA, y cuando se encuentran se produce la terminación de la traducción. Las mutaciones que resultan en cualquiera de estos tres codones en el interior de un gen también provocan la terminación. En consecuencia, se sintetiza sólo un polipéptido parcial, ya que es prematuramente liberado del ribosoma. Cuando se produce uno de estos cambios, se denomina **mutación sin sentido**.

Es interesante señalar que una mutación diferente en un segundo gen puede provocar la supresión de la terminación prematura (denominadas **mutaciones supresoras**). Estas mutaciones hacen que la señal de terminación de la cadena sea leída como un codón «con sentido». Generalmente, la «corrección» inserta un aminoácido diferente al que había en la proteína silvestre. Sin embargo, si no se altera drásticamente la estructura de la proteína, puede funcionar casi con normalidad. Por lo tanto, esta segunda mutación ha «suprimido» la característica mutante como consecuencia del cambio inicial a un codón de terminación.

Las mutaciones supresoras de las mutaciones sin sentido se producen en genes que especifican los tRNA. Si la mutación provoca un cambio en el anticodón de tal modo que se convierta en complementario de un codón de terminación, puede producirse la inserción de un aminoácido y por lo tanto la supresión.

13.5 El código genético se ha confirmado en estudios del fago MS2

Todos los aspectos del código genético tratados hasta ahora producen un cuadro bastante completo. El código está formado por tripletes, es degenerado, inequívoco, y sin signos de puntuación internos, pero contiene puntuación respecto a las señales de iniciación y de terminación. Estos principios particulares se han confirmado mediante el análisis detallado del bacteriófago de RNA MS2 realizado por Walter Fiers y sus colaboradores.

MS2 es un bacteriófago que infecta *E. coli*. Su ácido nucleico (RNA) contiene unos 3500 ribonucleótidos, y codifica sólo tres genes. Estos genes especifican la cubierta proteica, una replicasa dirigida por RNA y una proteína de maduración (la proteína A). Este sistema simple de un genoma pequeño y pocos productos génicos permitió a Fiers y sus colaboradores secuenciar el gen y sus productos. La secuencia de aminoácidos de la cubierta proteica se terminó en 1970, y la secuencia nucleotídica del gen y de algunos nucleótidos de cada extremo se publicó en 1972.

Cuando se compara la naturaleza química del gen con la de la proteína se observa una relación de colinealidad. Es decir, según el diccionario de código, la secuencia lineal de nucleótidos (y por lo tanto la secuencia de codones) se corresponde con absoluta precisión con la secuencia lineal de los aminoácidos en la proteína. Además, el codón para el primer aminoácido es AUG, el codón iniciador común; y el codón para el último aminoácido está seguido por dos codones de terminación consecutivos, UAA y UAG.

En 1976 se secuenciaron los otros dos genes y sus productos proteicos, proporcionando confirmaciones similares. El análisis muestra claramente que el código genético en los virus es idéntico al establecido en sistemas bacterianos. Otras pruebas sugieren que el código también es idéntico en eucariotas.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se comprobaron experimentalmente los codones en tripletes utilizando el bacteriófago MS2?

[2] Históricamente, se utilizaban los términos ámbar (UAG), ocre (UAA) y opal (UGA) para distinguir las tres posibilidades de mutación.

Nota del traductor: en este sentido, por ejemplo, los mutantes con defectos debidos a un codón ámbar anormal (mutante) se denominan mutantes ámbar, y sus supresores supresores de ámbar. Se utiliza la misma terminología para los otros dos codones de terminación.

13.6 El código genético es casi universal

Entre 1960 y 1978 se suponía de forma generalizada que se encontraría que el código genético es universal, actuando igual en virus, bacterias, arqueas y eucariotas. Indudablemente, las características del mRNA y de la maquinaria de la traducción parecen ser muy semejantes en estos organismos. Por ejemplo, sistemas exentos de células provenientes de bacterias pueden traducir mRNA eucariótico. Se demostró que un poli-U estimulaba la traducción de fenilalanina en sistemas exentos de células cuando los componentes provenían de eucariotas. Muchos experimentos recientes de DNA recombinante (véase el Capítulo 19) han revelado que los genes eucarióticos pueden insertarse en células bacterianas, transcribirse y traducirse. Entre los eucariotas, se ha inyectado mRNA de ratón y conejo a huevos de anfibio donde se ha traducido eficazmente. Para la mayoría de genes eucarióticos que se han secuenciado, como los de las moléculas de hemoglobina, la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas coincide con el diccionario de codones establecido a partir de los estudios en bacterias.

Sin embargo, en 1979, diversas publicaciones sobre las características codificantes del DNA mitocondrial (mtDNA) de levaduras y de la especie humana alteró el principio de universalidad del lenguaje genético. Desde entonces, se ha examinado el mtDNA de muchos otros organismos.

Se secuenciaron fragmentos clonados de mtDNA y se compararon con las secuencias de aminoácidos de diversas proteínas mitocondriales, lo que reveló varias excepciones al diccionario del código (Tabla 13.5). Lo más sorprendente fue que el codón UGA, que generalmente especifica la terminación, especifica la inserción de triptófano durante la traducción en mitocondrias de levadura y de humanos. En mitocondrias humanas, AUA, que normalmente especifica isoleucina, dirige la inserción interna de metionina. En mitocondrias de levadura, se inserta treonina en vez de leucina al encontrarse CUA en el mRNA.

En 1985 se descubrieron otras varias excepciones al código genético habitual en la bacteria *Mycoplasma capricolum* y en genes nucleares de los protozoos ciliados *Paramecium*, *Tetrahymena* y *Stylonychia*. Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 13.5, una alteración convierte uno de los codones de terminación (UGA) a triptófano. Otras diversas alteraciones convierten un codón de terminación en un codón que especifica glutamina (gln). Estos cambios son importantes ya que implican a un procariota y a varios eucariotas.

Obsérvese el patrón aparente de varias de las asignaciones de codón alteradas. El cambio en las capacidades codificantes implica solo un cambio de reconocimiento en la tercera posición, la del tambaleo. Por ejemplo, AUA especifica isoleucina en el citoplasma y metionina en la mitocondria. En el citoplasma, AUG especifica metionina. Del mismo modo, UGA provoca terminación en el citoplasma pero incorpora triptófano en la mitocondria. En el citoplasma, UGG especifica triptófano. Se ha sugerido que estos cambios de reconocimiento del codón podrían representar una tendencia evolutiva hacia la reducción del número de tRNA que son precisos en las mitocondrias; Por ejemplo, las mitocondrias humanas sólo codifican 22 tRNA. Sin embargo, hasta que no se conozcan otros ejemplos, las diferencias deben considerarse como excepciones a la normas codificantes generales establecidas.

TABLA 13.5 EXCEPCIONES AL CÓDIGO UNIVERSAL

Codón	Palabra de código normal	Palabra del código alterado	Fuente
UGA	terminación	trp	Mitocondrias humanas y de levadora *Mycoplasma*
CUA	leu	thr	Mitocondrias de levadura
AUA	ile	met	Mitocondrias humanas
AGA	arg	terminación	Mitocondrias humanas
AGG	arg	terminación	Mitocondrias humanas
UAA	terminación	gln	*Paramecium, Tetrahymena,* y *Stylonychia*
UAG	terminación	gln	*Paramecium*

13.7 Diferentes puntos de iniciación generan genes solapados

En este capítulo hemos establecido que el código genético no es solapado. Esto significa que cada ribonucleótido en un mRNA forma parte de un único triplete. Sin embargo, esta característica del código no descarta la posibilidad de que un único mRNA tenga múltiples puntos de iniciación para la traducción. Si fuese así, estos puntos podrían formar, en teoría, diversas fases de lectura en un mismo mRNA, especificando más de un polipéptido. En la Figura 13.8(a) se esquematiza este concepto de **genes solapados**.

Cuando se investigó minuciosamente el fago ϕX174 se sospechó que esto podría estar realmente ocurriendo en algunos virus. Su cromosoma circular de DNA está formado por 5386 nucleótidos, que deberían codificar 1795 aminoácidos como máximo, lo suficiente para cinco o seis proteínas. Sin embargo, se observó que este pequeño virus sintetiza, de hecho, 11 proteínas formadas por más de 2300 aminoácidos. La comparación entre la secuencia nucleotídica del DNA y la de los aminoácidos de los polipéptidos sintetizados ha clarificado esta paradoja.

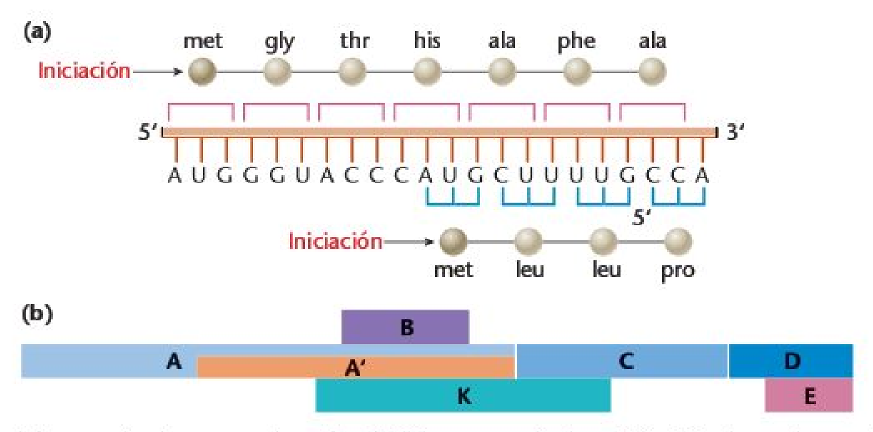


FIGURA 13.8 Esquema del concepto de genes solapados. (a) Una secuencia de mRNA iniciada en dos posiciones diferentes AUG en distinta fase de lectura dará dos secuencias aminoacídicas diferentes. (b) Posiciones relativas de las secuencias que codifican siete polipéptidos del fago ϕX174.

Se han descubierto al menos 4 casos de iniciación múltiple, formándose genes solapados [Figura 13.8(b)].

La secuencia que especifica los polipéptidos K y B se inicia dentro de la secuencia que especifica el polipéptido A, pero en una fase de lectura diferente. La secuencia K se solapa con la secuencia adyacente que especifica el polipéptido C. La secuencia E tiene una fase de lectura diferente que D, pero se inicia dentro de ésta. Finalmente, la secuencia A′, con la misma fase que la secuencia A, empieza en medio de ésta. Ambas terminan en el mismo punto. En total, se forman siete polipéptidos diferentes a partir de la secuencia de DNA que, de otra manera, habría especificado sólo tres (A, C y D).

Se ha observado una situación similar en otros virus, como el fago G4 y el virus animal SV40. Como ϕX174, el fago G4 tiene una molécula circular de DNA de cadena sencilla. La utilización de pautas de lectura solapadas optimiza el uso de la limitada cantidad de DNA que hay en los virus pequeños. Sin embargo, esta manera de almacenar información tiene el claro inconveniente de que una única mutación puede afectar a más de una proteína e incrementar así las posibilidades de que el cambio sea deletéreo o letal. En el ejemplo que acabamos de discutir, una única mutación en la unión de los genes A y C podría afectar a tres proteínas (las proteínas A, C y K). Esta podría ser la razón de que los genes solapados no sean comunes en otros organismos.

13.8 La transcripción sintetiza RNA sobre un molde de DNA

Mientras se estaba estudiando el código genético, ya era bastante claro que las proteínas eran el producto final de muchos genes. Así, mientras algunos genéticos estaban intentando aclarar el código, otras investigaciones dirigían sus esfuerzos hacia las características de la expresión genética. La pregunta central era cómo podía el DNA, un ácido nucleico, especificar una proteína compuesta de aminoácidos.

Es un proceso complejo realizado en múltiples pasos, y que empieza con la transferencia de la información genética almacenada en el DNA al RNA. El proceso por el que se sintetizan las moléculas de RNA sobre un molde de DNA se denomina **transcripción**. El resultado es una molécula de mRNA complementaria a la secuencia del gen de una de las dos cadenas de la doble hélice. A su vez, cada codón en triplete del mRNA es complementario a la región anticodón del tRNA correspondiente, por lo que durante la traducción se incorpora el aminoácido correcto a la cadena polipeptídica. La importancia del proceso de transcripción es enorme, puesto que representa el paso inicial del proceso de flujo de información dentro de la célula. Las siguientes observaciones sugieren la idea de que el RNA participa como molécula intermediaria en el proceso de flujo de información entre el DNA y las proteínas:

1. El DNA está mayoritariamente asociado a los cromosomas, en el núcleo de las células eucarióticas. Sin embargo, la síntesis proteica se produce en asociación con ribosomas localizados en el citoplasma, fuera del núcleo. Por lo tanto, el DNA no parece participar directamente en la síntesis de proteínas.
2. El RNA se sintetiza en el núcleo de las células eucarióticas, donde se encuentra el DNA, y es químicamente parecido a él.
3. Una vez sintetizado, la mayor parte del RNA migra hacia el citoplasma, donde se produce la síntesis de proteínas (la traducción).
4. Normalmente, en una célula la cantidad de RNA es proporcional a la de proteína.

Como la mayoría de las nuevas ideas en genética molecular, las primeras pruebas experimentales que apoyaban la existencia de un RNA intermediario se basaron en investigaciones en bacterias y en sus fagos.

13.9 Estudios con bacterias y con fagos proporcionan pruebas de la existencia del mRNA

En dos artículos publicados en 1956 y 1958, Elliot Volkin y sus colaboradores dieron a conocer sus análisis sobre el RNA producido tras la infección de *E. coli* por un bacteriófago. Utilizando el isótopo ^{32}P para seguir el RNA recién sintetizado, encontraron que su composición de bases se parecía mucho a la del fago de DNA y que era diferente de la del RNA bacteriano (Tabla 13.6). Aunque este RNA recién sintetizado era inestable, o tenía una vida corta, su producción precedía a la síntesis de las nuevas proteínas fágicas. Por eso, Volkin y sus colaboradores consideraron la posibilidad de que la síntesis de RNA fuese un paso previo en el proceso de la síntesis proteica.

Aunque se sabía que los ribosomas participaban en la síntesis de proteínas, su función en este proceso no estaba clara. Como dijimos anteriormente, una posibilidad era que cada ribosoma fuese específico de la proteína que se sintetiza asociada a él. Es decir, tal vez la información genética del DNA se transfería al RNA de un ribosoma durante su síntesis, de manera que cada grupo de ribosomas estuviese limitado a traducir unas proteínas concretas. La hipótesis alternativa era que los ribosomas fuesen «mesas de trabajo» no específicas de la síntesis proteica, y que la información genética específica yaciese en un RNA «mensajero».

En un elegante experimento en el que se utilizó el sistema *E. coli*-fago, cuyo resultado se publicó en 1961, Sidney Brenner, Françoise Jacob y Matthew Meselson esclarecieron esta cuestión. Marcaron ribosomas de *E. coli* no infectada con isótopos «pesados», y luego permitieron que se produjese infección de fagos en presencia de precursores radioactivos de RNA. Siguiendo estos componentes durante la traducción, los investigadores demostraron que la síntesis de proteínas fágicas (dirigida por el RNA recién sintetizado) se realizaba en los ribosomas bacterianos ya presentes antes de la infección. Parecía que los ribosomas no eran específicos, lo que reforzó la hipótesis de que algún otro tipo de RNA sirve de intermediario en el proceso de síntesis proteica.

Ese mismo año, Sol Spiegelman y sus colaboradores llegaron a la misma conclusión al aislar RNA fágico marcado con ^{32}P tras una infección en bacterias, y utilizarlo en experimentos de hibridación molecular. Estos científicos intentaron hibridar este RNA al DNA de los fagos y de las bacterias en experimentos distintos. El RNA hibridó únicamente con el DNA del fago, mostrando que su secuencia de bases era complementaria a la información genética del virus.

Los resultados de estos experimentos están de acuerdo con el concepto de un RNA mensajero (mRNA) fabricado sobre un molde de DNA, y que luego dirige la síntesis de proteínas específicas en asociación con los ribosomas. En 1961, Françoise Jacob y Jacques Monod propusieron formalmente este concepto como parte de un modelo de regulación génica en bacterias. Desde entonces, se ha aislado y estudiado a fondo el mRNA. Ya no hay dudas sobre su función en los procesos genéticos.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿De qué prueba disponemos para afirmar que la transferencia de información genética dentro de la célula, almacenada en el DNA, se transfiere inicialmente a un intermediario de RNA?

13.10 La RNA polimerasa dirige la síntesis de RNA

Para demostrar que se puede sintetizar RNA sobre un molde de DNA, es necesario demostrar que hay una enzima capaz de dirigir esta síntesis. En 1959, diversos investigadores, incluido Samuel Weiss, habían descubierto independientemente dicha molécula en hígado de rata. Denominada **RNA polimerasa**, tiene los mismos requisitos generales en cuanto a substrato

TABLA 13.6 COMPOSICIÓN DE BASES (EN PORCENTAJE DE MOLES) DEL RNA PRODUCIDO INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA INFECCIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS T2 Y T7 EN *E. COLI* COMPARADO CON LA COMPOSICIÓN DEL RNA DE *E. COLI* NO INFECTADA

	Adenina	Timina	Uracilo	Citosina	Guanina
RNA después de la infección en células infectadas con T2	33	—	32	18	18
DNA de T2	32	32	—	17*	18
RNA después de la infección en células infectadas con T7	27	—	28	24	22
DNA de T7	26	26	—	24	22
RNA de *E. coli*	23	—	22	18	17

* 5-hidroximetil citosina

Fuente: Volkin y Astrachan (1956); y Volkin, Astrachan, y Countryman (1958).

que la DNA polimerasa, con la importante excepción de que los nucleótidos que utiliza como substrato contienen al azúcar ribosa en vez de desoxirribosa. A diferencia de la DNA polimerasa, no precisa un cebador para iniciar la síntesis. La base inicial permanece como nucleósido trifosfato (NTP). La reacción general que resume la síntesis de RNA sobre un molde de DNA se puede expresar como:

$$n(\text{NTP}) \xrightarrow[\text{enzima}]{\text{DNA}} (\text{NMP})_n + n(\text{PP}_i)$$

Como muestra la ecuación, los nucleósidos trifosfato (NTP) sirven de substrato para la enzima, que cataliza la polimerización de nucleósidos monofosfato (NMP), o nucleótidos, en cadenas polinucleotídicas $(\text{NMP})_n$. Durante la síntesis, los nucleótidos se unen por enlaces fosfodiéster 5′-3′ (véase la Figura 10.8). La energía creada al cortar el precursor trifosfato en la forma monofosfato impulsa la reacción, y se producen fosfatos inorgánicos (PP_i).

Una segunda ecuación resume la adición secuencial de cada ribonucleótido a medida que prosigue el proceso de transcripción:

$$(\text{NMP})_n + \text{NTP} \xrightarrow[\text{enzima}]{\text{DNA}} (\text{NMP})_{n+1} + \text{PP}_i$$

Como muestra esta ecuación, cada paso de la transcripción implica la adición de un ribonucleótido (NMP) a la creciente cadena polirribonucleotídica $(\text{NMP})_{n+1}$, utilizando como precursor un nucleósido trifosfato (NTP).

Se ha caracterizado a fondo la RNA polimerasa de *E. coli*, que está formada por diversas subunidades designadas α, β, β', ω y σ. La forma activa de la enzima, la **holoenzima**, contiene las subunidades $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, y tiene un peso molecular de casi 500.000 daltons. De estas subunidades, los polipéptidos β y β' son los que proporcionan la base catalítica y el sitio activo para la transcripción. Como veremos, la **subunidad σ** [Figura 13.9(a)] desempeña una función reguladora en la iniciación de la transcripción.

Si bien en *E. coli* hay un único tipo de esta enzima, presenta distintos tipos de subunidad σ, lo que genera variación en la holoenzima de la polimerasa. En cambio, los eucariotas presentan diversas formas de RNA polimerasa, cada una de las cuales está formada por un número mayor de subunidades polipeptídicas que la forma bacteriana de la enzima. Posteriormente en este mismo capítulo volveremos a tratar la forma eucariótica de esta enzima.

Ahora resuelva esto

En el Problema 13.23 de la página 379 se le pide que considere el resultado de la transferencia de información complementaria del DNA al RNA y a los aminoácidos codificados en esta información.

Sugerencia: En el RNA, el uracilo es complementario a la adenina y, si bien el DNA es quien almacena la información genética en la célula, el código que se traduce está contenido en el RNA complementario a la cadena molde del DNA del gen en cuestión.

Los promotores, la unión al molde y la subunidad sigma

La transcripción da por resultado la síntesis de una molécula de RNA de cadena sencilla, complementaria a una región de una de las dos cadenas del DNA de doble hélice. En esta discusión denominaremos *cadena molde* a la cadena de DNA que se transcribe, y *cadena acompañante* a su complementaria[3].

El paso inicial se conoce como **unión a la cadena molde** [Figura 13.9(b)]. En bacterias, el lugar para esta unión inicial se establece como resultado del reconocimiento de una secuencia de DNA específica denominada **promotor** por parte de la subunidad σ (sigma) de la polimerasa. Estas regiones se localizan en la región 5′ (corriente arriba) del punto inicial de transcripción del gen. Se cree que la enzima «explora» un trozo de DNA hasta que reconoce la región promotora, y se une aproximadamente a unos 60 pares de nucleótidos de la hélice, de los que 40 están corriente arriba del punto inicial de transcripción. Una vez se ha producido, la hélice se desnaturaliza o desespiraliza localmente, haciendo que la cadena molde de DNA sea accesible a la acción de la enzima. El punto en que realmente empieza la transcripción se denomina **sitio de inicio de la transcripción**.

No se puede acentuar excesivamente la importancia de las secuencias promotoras. Rigen la eficiencia de la iniciación de la transcripción. En bacterias, se reconocen tanto promotores fuertes como débiles, dando una variación en la iniciación de una vez cada 1 ó 2 segundos a solo una vez cada 10 ó 20 minutos. Mutaciones en las secuencias promotoras pueden tener el efecto de reducir o incrementar la iniciación de la expresión génica. Puesto que la interacción de los promotores con la RNA polimerasa es quien rige la transcripción, las características de la unión entre ellos es el tema central a tratar durante la regulación génica, la materia de los Capítulos 16 y 17. Aunque en esos capítulos daremos información más detallada de las interacciones promotor-enzima, es adecuado introducir ahora dos cuestiones.

En primer lugar abordaremos el concepto de **secuencia consenso** de DNA. Estas secuencias comparten homología en genes diferentes de un mismo organismo, o en uno o más genes de organismos relacionados. Su conservación durante la evolución certifica las características importantes de su función en los procesos biológicos. En los promotores bacterianos se han encontrado dos de estas secuencias. Una, TATAAT, se localiza 10 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (la región −10, o **caja de Pribnow**). La otra, TTGACA, se localiza 35 nucleótidos corriente arriba (la región −35). Se dice que estas secuencias son **elementos de actuación en *cis***. La utilización del término *cis* proviene de la nomenclatura de química orgánica, y significa «próximo a» o «al

[3] *Nota del traductor:* también se utilizan las expresiones *cadena con sentido* y *cadena antisentido* para designar a la cadena molde y a la cadena acompañante respectivamente.

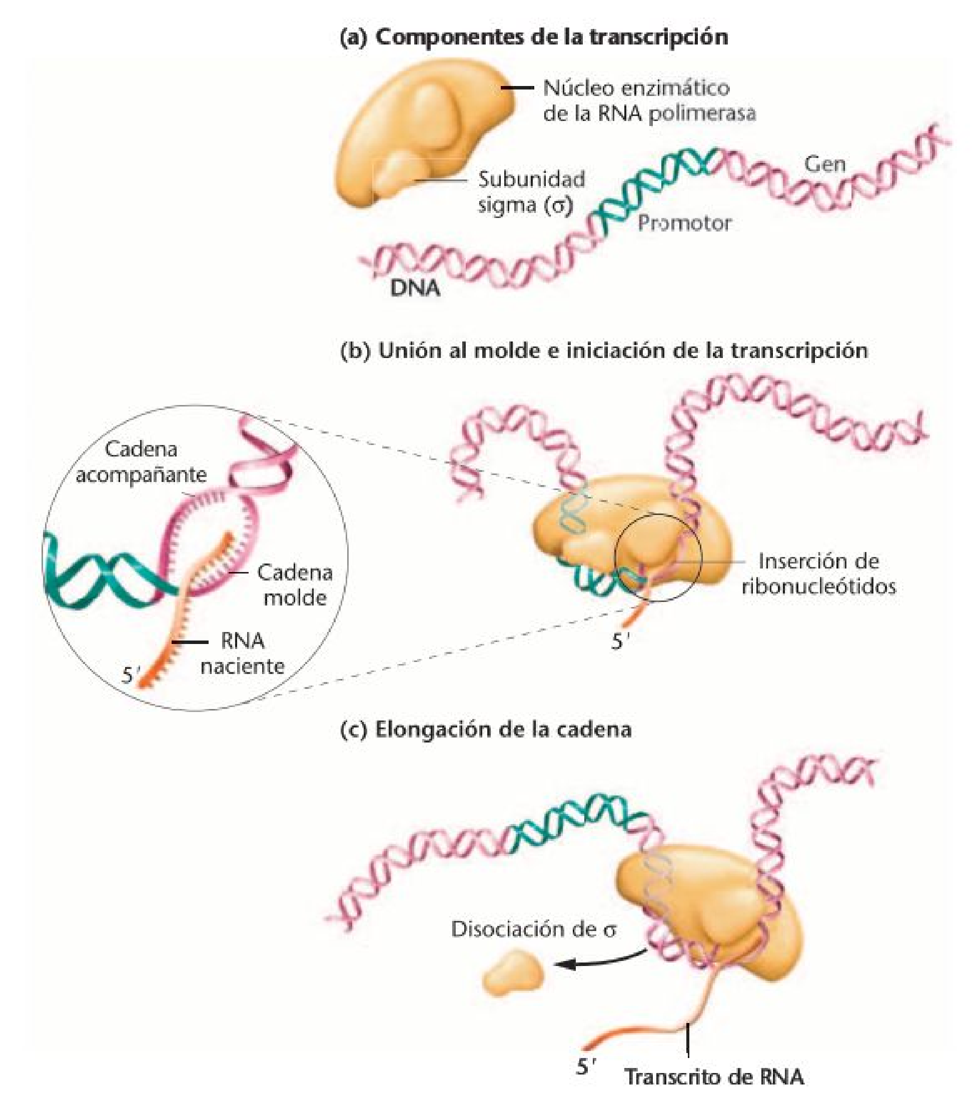


FIGURA 13.9 Representación esquemática de los primeros estadios de la transcripción en procariotas, que incluye: (a) los componentes del proceso; (b) la unión al molde en el sitio −10 que implica a la subunidad sigma de la RNA polimerasa y la iniciación posterior de la síntesis de RNA; y (c) la elongación de la cadena, después de que la subunidad sigma se haya disociado del complejo de transcripción y la enzima se mueca a lo largo del molde de DNA.

mismo lado que» otros grupos funcionales, en comparación con estar «al otro lado de», o *trans*. En genética molecular, los elementos en *cis* son partes adyacentes de la misma molécula de DNA que se encuentran en el propio gen. En cambio, los **factores de actuación en *trans*** son moléculas que se unen a estos elementos de DNA. Como veremos pronto, en la mayor parte de los genes eucarióticos estudiados se ha identificado una secuencia consenso comparable a la de la región −10. Debido a que es rica en residuos de adenina y timina, se le denomina **caja TATA**.

El segundo punto general es que el grado de unión de la RNA polimerasa a los diferentes promotores varía enormemente, lo que provoca la expresión génica variable antes mencionada. Actualmente este hecho se atribuye a la variación de la secuencia de los promotores.

Una última cuestión general hace referencia a la subunidad sigma (σ) en bacterias. El tipo principal se designa σ^{70}, por su peso molecular de 70 kilodaltons (kDa). Aunque la mayoría de promotores bacterianos reconocen este tipo, en *E. coli* hay varias formas alternativas de RNA polimerasa que tienen subunidades especiales asociadas a ellos (p.e. σ^{32}, σ^{45}, σ^{70}, σ^{S} y σ^{E}). Estas subunidades reconocen diferentes secuencias promotoras y proporcionan especificidad al inicio de la transcripción.

Iniciación, elongación y terminación de la síntesis de RNA

Una vez la RNA polimerasa ha reconocido el promotor y se ha unido a él, cataliza la **iniciación**, la inserción del primer ribonucleósido trifosfato 5′, que es complementario al primer nu-

cleótido en el lugar de inicio de transcripción de la cadena de DNA molde. Como ya se ha dicho, no se precisa cebador. Al proseguir la polimerización del RNA, los ribonucleótidos complementarios posteriores se insertan y se unen entre sí por enlaces fosfodiéster. Este proceso prosigue en dirección 5′-3′ formando un dúplex de DNA/RNA temporal de 8 pares de bases, cuyas cadenas son antiparalelas entre sí [Figura 13.9(b)].

Después de que se hayan unido unos cuantos ribonucleótidos a la cadena de RNA en crecimiento, la subunidad σ se disocia de la holoenzima, y la **elongación de la cadena** continua bajo la dirección del núcleo de la enzima [Figura 13.9(c)]. En *E. coli*, este proceso se realiza a una velocidad aproximada de 50 nucleótidos/segundo a 37°C.

Con el tiempo, la enzima recorre todo el gen y encuentra una secuencia nucleotídica específica que actúa de señal de terminación. Estas secuencias de terminación, de unos 40 pares de bases de longitud son extremadamente importantes en procariotas debido a la gran proximidad entre el final de un gen y las secuencias corriente arriba del gen adyacente. Un aspecto interesante de la terminación en bacterias es que la secuencia mencionada se transcribe a RNA. La característica especial de esta secuencia de terminación provoca que el transcrito recién formado se pliegue sobre sí mismo formando puentes de hidrógeno, lo que genera una **estructura secundaria en horquilla**. Esta horquilla es importante para la terminación. En algunos casos, la terminación de la síntesis es dependiente de un **factor de terminación**, denominado **rho** (ρ). Rho es una gran proteína hexamérica que interacciona físicamente con el transcrito de RNA en crecimiento, facilitando la terminación de la transcripción.

Cuando se produce la terminación, la enzima deja de añadir ribonucleótidos, se libera la molécula de RNA transcrita del molde y el núcleo de la enzima polimerasa se disocia. El resultado final de la transcripción es la síntesis de una molécula de RNA que es exactamente complementaria a la secuencia de DNA de la cadena molde del gen. Donde quiera que haya un residuo A, T, C o G, a la molécula de RNA se incorpora el correspondiente residuo U, A, G o C, respectivamente. En última instancia, estas moléculas de RNA proporcionan la información que conduce a la síntesis de todas las proteínas presentes en la célula.

Es importante observar que, a menudo, en bacterias, grupos de genes cuyos productos están implicados en una misma vía metabólica están agrupados en el cromosoma. En muchos casos, son contiguos y a todos ellos les falta la señal que codifica el final de transcripción, excepto al último. El resultado es que durante la transcripción se produce un mRNA largo, que codifica más de un gen. Ya que históricamente, en fagos y en bacterias, los genes se denominan cistrones, este RNA se denomina **mRNA policistrónico**. Puesto que en general los productos de los genes producidos de esta manera se necesitan al mismo tiempo, esta es una manera eficiente de transcribir y posteriormente traducir la información genética necesaria. En eucariotas, la norma son los **mRNA monocistrónicos**.

13.11 La transcripción en eucariotas presenta diversas diferencias respecto a la transcripción en procariotas

Gran parte del conocimiento que se tiene de la transcripción proviene de trabajos en procariotas. Muchos aspectos generales de la mecánica de este proceso son semejantes en eucariotas, pero hay varias diferencias importantes:

1. En eucariotas, la transcripción se produce dentro del núcleo, y es dirigida por tres tipos diferentes de RNA polimerasas. A diferencia de los procariotas, el transcrito de RNA no se puede asociar a los ribosomas antes de que se haya completado la transcripción. Para traducirse, el mRNA debe salir del núcleo hacia el citoplasma.
2. La iniciación de la transcripción de los genes eucarióticos precisa que la compacta fibra de cromatina, que se caracteriza por el enrollamiento de los nucleosomas (véase el Capítulo 12), se desenrolle y el DNA sea así accesible a la RNA polimerasa y a otras proteínas reguladoras. Esta transición se denomina **remodelación de la cromatina**, lo que refleja la dinámica del cambio conformacional que se produce al abrirse la hélice de DNA.
3. La iniciación y la regulación de la transcripción comprenden una mayor interacción entre secuencias de DNA corriente arriba que actúan en *cis* y factores proteicos que participan en la estimulación e iniciación de la transcripción actuando en *trans*. Además de los promotores, hay también otras unidades de control denominadas **intensificadores**, que pueden estar en la región reguladora 5′ corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción, pero que también se han encontrado dentro del gen e incluso en la región 3′ corriente abajo más allá de la secuencia codificante.
4. La maduración del mRNA eucariótico a partir del transcrito de RNA primario comprende muchos estadios complejos denominados en conjunto «procesado». Un paso inicial es la adición de una caperuza en 5′ (*5′-cap)* y de una cola en 3′ (*3′-tail*) a la mayoría de transcritos destinados a convertirse en mRNA. Otras modificaciones considerables se producen en la secuencia interna de nucleótidos de los transcritos de RNA eucarióticos que están destinados a servir de mRNA. Muy a menudo, los transcritos iniciales (o primarios) son más largos que los que después se van a traducir. Dichos transcritos, denominados a veces **pre-mRNA**, son parte de un grupo de moléculas que se encuentran sólo en el núcleo, un grupo que en conjunto se conoce como **RNA nuclear heterogéneo (hnRNA)**. Tales moléculas de RNA tienen un tamaño variable y están acomplejadas a proteínas, formando las **partículas ribonucleoproteicas nuclea-**

res heterogéneas (**hnRNP**). Sólo un 25 por ciento de las moléculas de hnRNA se convierten en mRNA. En las que se convierten en mRNA, se cortan cantidades considerables de su secuencia de ribonucleótidos, y los segmentos restantes se unen de nuevo antes de ser exportadas desde el núcleo y de ser traducidas. Este fenómeno ha hecho aparecer en eucariotas los conceptos de **genes fragmentados** y de **corte y empalme**.

En el resto de este capítulo nos fijaremos en los detalles básicos de la transcripción en eucariotas. El proceso de transcripción se encuentra altamente regulado, lo que determina qué secuencias de DNA se copian a RNA, cuándo se copian y con qué frecuencia se transcriben. En el Capítulo 17 trataremos los temas directamente relacionados con la regulación de la transcripción en eucariotas.

Iniciación de la transcripción en eucariotas

El reconocimiento de regiones muy específicas de DNA por parte de la RNA polimerasa es la base de un funcionamiento genético ordenado en todas las células. La RNA polimerasa eucariótica presenta tres formas especiales, cada una de las cuales transcribe diferentes tipos de genes, como se indica en la Tabla 13.7. Todas ellas son más grandes y más complejas que la única enzima procariótica. En levadura, por ejemplo, la holoenzima está formada por dos subunidades grandes y por 10 subunidades más pequeñas. Respecto a la unión inicial al molde y a las regiones promotoras, se sabe casi todo de la RNA polimerasa II (RNP II), que transcribe todos los mRNA en eucariotas.

La actividad de la RNP II es regulada por elementos del propio gen que actúan en *cis* y por algunos factores de actuación en *trans* que se unen al DNA de estos primeros elementos. Al menos hay tres elementos de DNA que actúan en *cis* que regulan la iniciación de la transcripción de RNP II. La primera de estas secuencias, denominada **núcleo del elemento promotor**, determina el lugar donde la RNP II se une al DNA y dónde empieza a copiar el DNA en RNA. Los otros dos tipos de secuencias reguladoras de DNA, denominadas **promotor** y **elementos intensificadores**, influyen en la eficiencia y en la tasa de transcripción de la RNP II, cuando el proceso continúa a partir del núcleo del elemento promotor. Recuerde que en procariotas la secuencia de DNA reconocida por la RNA polimerasa se denomina promotor. En los eucariotas, sin embargo, la iniciación de la transcripción es controlada por estos elementos de DNA de actuación en *cis*, que *en conjunto* se denominan promotor. Por lo tanto, en eucariotas la palabra promotor hace referencia tanto a la secuencia núcleo del promotor, a la que se une la RNP II, como al promotor y a los elementos intensificadores del DNA, que influyen la actividad de la RNP II.

TABLA 13.7 RNA POLIMERASAS EN EUCARIOTAS

Tipo	Producto	Localización
I	rRNA	Nucleolo
II	mRNA, snRNA	Nucleoplasma
III	5S rRNA, tRNA	Nucleoplasma

Un ejemplo de núcleo del elemento promotor de actuación en *cis* es el denominado **Goldberg-Hogness** o **caja TATA**, que se encuentra en caso todos los genes eucarióticos. Localizada a unos 30 nucleótidos corriente arriba (−30) del punto de inicio de transcripción, la caja TATA presenta una secuencia consenso que es un heptanucleótido formado sólo por residuos A y T (TATAAAA). Su secuencia y función es análoga a la encontrada en la región promotora −10 de los genes procarióticos. La caja TATA es el sitio dónde la RNP II se une al molde de DNA, y típicamente la transcripción empieza aproximadamente a 25-30 pares de bases corriente debajo de ella. De hecho, la localización de la caja TATA determina la posición nucleotídica exacta en la que empieza la transcripción. Como en los procariotas, esta posición se denomina *sitio de inicio de la transcripción*.

Otro ejemplo de secuencia de DNA de actuación en *cis* que forma parte del promotor eucariótico es la **caja CAAT**. Esta secuencia específica de DNA, que contiene la secuencia consenso GGCCAATCT se localiza típicamente corriente arriba (en la región 5′ del gen), dentro de los 100 primeros nucleótidos a partir del sitio de inicio de la transcripción. Todavía hay más tipos de elementos promotores corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, y la mayoría de genes contienen uno o más de ellos. Junto con la caja CAAT, influencian la eficiencia del promotor. La localización de cada elemento se basa en estudios de deleción de regiones particulares del promotor, cada una de las cuales reduce la eficiencia de la transcripción.

El tercer tipo de secuencia de elemento regulador de DNA de actuación en *cis* son los intensificadores. Aunque su localización puede variar, los intensificadores se encuentran a menudo más corriente arriba que las regiones que acabamos de tratar, o incluso corriente abajo o dentro del gen. Tienen el efecto de modular la transcripción a distancia. Aunque no pueden participar directamente en la unión de la RNP II al núcleo del promotor, son esenciales para una iniciación altamente eficaz de la transcripción.

Complementando las extensas secuencias reguladoras que actúan en *cis* hay diversos factores que actúan en trans, cuya función es facilitar la unión de la RNP II y, por lo tanto, la iniciación de la transcripción. Son proteínas denominadas **factores de transcripción**. Hay dos categorías generales de factores de trascripción: los **factores de transcripción generales,** que son absolutamente necesarios para la transcripción mediada por RNP II, y los **factores de transcripción específicos**, que influencian la eficiencia de se tasa de transcripción. En el Capítulo 17 trataremos con más detalles esta segunda categoría de factores de transcripción. Sin embargo, los factores de transcripción generales son esenciales ya que la RNA polimerasa II

no puede unirse directamente a los promotores eucarióticos ni iniciar la transcripción sin su presencia. Los factores de transcripción generales que participan en la unión de la RNP II en la especie humana están bien caracterizados y se designan como **TFIIA**, **TFIIB**, etc. De ellos, TFIID se une directamente a la secuencia de la caja TATA. TFIID está formado por unas 10 subunidades polipeptídicas, una de las cuales suele denominarse **proteína de unión a TATA (TBP)**. Una vez se produce la unión inicial al DNA, al menos otros siete factores de transcripción se unen secuencialmente a TFIID, formando un extenso complejo de preiniciación al que luego se une la RNA polimerasa II.

Se han descubierto factores de transcripción con una actividad similar en diversos eucariotas, como *Drosophila* y levadura. Las secuencias nucleotídicas de todos los organismos examinados muestran una alto grado de conservación. En el Capítulo 17 consideraremos la función de los factores de transcripción durante la regulación génica de los eucariotas, y hablaremos de los diversos dominios de unión al DNA que los caracterizan.

Descubrimientos recientes sobre la función de la RNA polimerasa

Una aproximación para incrementar la comprensión del proceso de transcripción es el estudio de los detalles de la estructura y la función del RNA. La capacidad de cristalizar grandes complejos ácido nucleico-proteína y de realizar análisis de difracción de rayos X a una resolución menor a los 5 Å ha permitido realizar algunas observaciones importantes. El trabajo de Roger Kornberg y sus colaboradores, utilizando la enzima aislada de levadura, ha sido especialmente informativo. Es importante destacar que una resolución menor a 2,8 Å permite visualizar cada aminoácido de cada proteína del complejo!

Lo que Kornberg descubrió proporciona una justificación muy detallada de los procesos más críticos de la transcripción. En levadura, la RNA polimerasa II contiene dos subunidades mayores y 10 subunidades más pequeñas, formando un enorme complejo tridimensional cuyo peso molecular es de unos 500 kDa. La región promotora del dúplex de DNA que debe transcribirse entra dentro de un surco cargado positivamente que se forma entre las dos subunidades mayores de la enzima. Estas subunidades forman una estructura parecida a un par de mandíbulas que presentan dos estados. Antes de asociarse al DNA, el surco está abierto; una vez se ha asociado, el surco se cierra parcialmente, asegurando el dúplex durante la iniciación de la transcripción. La región crítica de la enzima implicada en esta transición tiene un tamaño de unos 50 kDa y se denomina *abrazadera*.

Una vez la abrazadera ha asegurado el dúplex de DNA, una pequeña región de éste se separa de un sitio concreto de la enzima denominado *centro activo*, en el que se iniciará la síntesis de RNA sobre la cadena molde de DNA. Sin embargo, todo este complejo es inestable, y muy a menudo la transcripción termina tras la incorporación de unos pocos ribonucleótidos. Aunque se desconoce el por qué, este proceso, denominado *transcripción abortiva*, se repite varias veces antes de formarse un híbrido DNA:RNA estable, que incluye la formación de un transcrito de 11 ribonucleótidos. Cuando sucede esto se supera la transcripción abortiva, se forma un complejo estable y la elongación del transcrito de RNA prosigue de verdad. Se dice que en este momento la transcripción ha alcanzado un nivel de polimerización del RNA de progreso rápido.

Al continuar la transcripción, la enzima se mueve a lo largo del DNA y, en cualquier momento dado, unos 40 pares de bases del DNA y 18 residuos de la cadena de RNA en crecimiento forman parte del complejo enzimático. El RNA acabado de sintetizar se mueve a través de un surco de la enzima y sale por debajo de una estructura denominada *tapa*, que se encuentra en la parte superior trasera. Se ha identificado otra área, denominada poro, en la base de la enzima. Es el punto de entrada al complejo de los precursores del RNA.

Con el tiempo, al continuar la transcripción, la enzima encuentra la porción del DNA que señala la terminación y el complejo se vuelve otra vez inestable, de forma muy parecida al estado inicial de transcripción abortiva. La abrazadera se abre y tanto el DNA como el RNA se liberan de la enzima al terminarse la transcripción. Esto completa el ciclo que constituye el paradigma de la transcripción. Durante la iniciación de la transcripción se forma un complejo inestable, cuando la elongación genera un dúplex de suficiente tamaño el complejo se estabiliza, y la inestabilidad vuele a caracterizar la terminación de la transcripción.

Estos hallazgos incrementan considerablemente nuestro conocimiento de la transcripción. Es significativo que todas las subunidades que forman el modelo de levadura de Kornberg son muy parecidas a sus correspondientes en la enzima humana. Nueve de la 10 subunidades también se han conservado en las otras formas de RNA polimerasa eucariótica (I y III). Basándose en la descripción anterior, intente visualizar mentalmente el proceso de la transcripción desde el momento en que el DNA se asocia a la enzima y hasta que el transcrito se libera del gran complejo molecular. Si ha desarrollado un conjunto claro de imágenes, no dude que ha adquirido una comprensión clara de la transcripción en los eucariotas, que es más compleja que en los procariotas.

El RNA nuclear heterogéneo y su procesamiento: las caperuzas y las colas

Vamos a continuar con la exposición suponiendo que se ha producido un transcrito inicial. El código genético está escrito en la secuencia ribonucleotídica del mRNA. Por supuesto, esta información se originó en la cadena molde del DNA, en la que hay secuencias complementarias de desoxirribonucleótidos. En bacterias, la relación entre DNA y RNA parece ser muy directa. La secuencia de bases del DNA se transcribe a una secuencia de mRNA, que inmediatamente se traduce a una secuencia de aminoácidos de acuerdo con el código genético. En eucariotas, en cambio, se produce un complejo procesa-

miento del mRNA antes de que éste sea transportado al citoplasma para participar de la traducción.

En 1970, las pruebas acumuladas mostraban que el mRNA eucariótico se transcribe inicialmente como una molécula precursora más larga que la que se traduce. Esta noción se basaba en la observación de James Darnell y sus colaboradores del RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) en núcleos de mamífero que contenía secuencias nucleotídicas comunes con las moléculas de mRNA más pequeñas que hay en el citoplasma. Propusieron que el transcrito inicial de un gen era una larga molécula de RNA que primero debía procesarse en el núcleo, antes de aparecer en el citoplasma como una molécula de mRNA madura. Los distintos pasos del procesamiento, que se tratan a continuación, están esquematizados en la Figura 13.10.

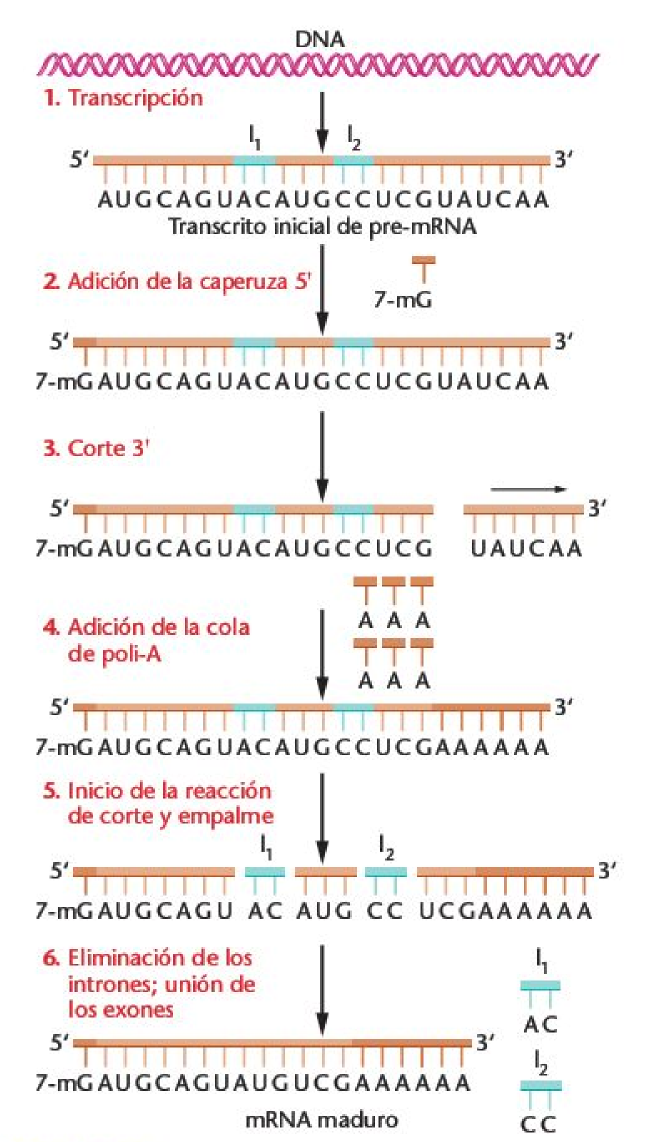


FIGURA 13.10 Procesamiento postranscripcional del RNA en eucariotas. El RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) se convierte en mensajero (mRNA), que contiene una caperuza 5′ y una cola 3′ de poli-A, y que entonces elimina los intrones.

La primera **modificación postranscripcional** de los transcritos de RNA eucariótico destinados a convertirse en mRNA abarcan el extremo 5′ de estas moléculas, dónde se añade una caperuza de **7-metil-guanosina (7mG)** (Figura 10.13, paso 2). La caperuza, que se añade incluso antes de que se complete el transcrito inicial, parece ser importante para el procesamiento posterior en el núcleo, quizá protegiendo el extremo 5′ de la molécula del ataque de nucleasas. Posteriormente, esta caperuza puede estar implicada en el transporte del mRNA maduro por la membrana nuclear hacia el citoplasma y en la iniciación de la traducción del RNA en proteína. La caperuza es bastante compleja y se caracteriza por una unión especial 5′-5′ entre la caperuza y el ribonucleótido inicial del mRNA. Algunos eucariotas contienen también un grupo metilo ($-CH_3$) en el carbono 2′ del azúcar ribosa de los dos primeros ribonucleótidos del RNA.

El descubrimiento de que tanto los hnRNA como los mRNA tienen en su extremo 3′ un alargamiento de hasta 250 residuos de ácido adenílico proporcionó más ideas sobre el procesamiento de los transcritos de RNA durante la maduración del mRNA. Estas **secuencias de poli-A** se añaden después de que se haya añadido la caperuza 5′-7mG. Primero se corta enzimáticamente el extremo 3′ del transcrito inicial en un punto situado a unos 10-35 ribonucleótidos de la secuencia AAUAAA (paso 3), altamente conservada. Luego se produce la poliadenilación mediante la adición secuencial de residuos de ácido adenílico (paso 4). Actualmente se ha encontrado poli-A en el extremo 3′ de casi todos los mRNA estudiados en diversos organismos eucarióticos. Los productos de los genes de las histonas parecen ser la excepción en los eucariotas.

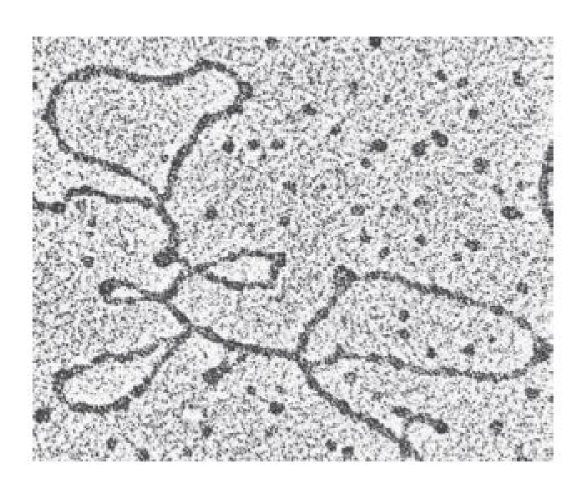
Si bien la secuencia AAUAAA no se encuentra en todos los transcritos eucarióticos, parece ser esencial para los que la presentan. Si una mutación altera esta secuencia, los transcritos no pueden añadir la cola de poli-A. En ausencia de esta cola, los transcritos de RNA se degradan rápidamente. Por lo tanto, tanto la caperuza 5′ como la cola de poli-A son críticas para que si el transcrito de RNA pueda seguir siendo procesado y sea transportado al citoplasma.

13.12 Las regiones codificantes de los genes eucarióticos están interrumpidas por secuencias intercaladas

Uno de los descubrimientos más excitantes en la historia de la genética molecular sucedió en 1977, cuando Susan Berget, Philip Sharp y Richard Roberts presentaron pruebas directas de que los genes de los virus animales contenían secuencias nucleotídicas *internas* que no se expresaban en la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifican. Estas secuencias internas de DNA se encuentran el transcrito inicial de RNA, pero se eliminan antes de que el mRNA maduro se traduzca (Fi-

gura 13.10, pasos 5 y 6). Se ha denominado a estos segmentos nucleotídicos **secuencias intercaladas**, y a los genes que las contienen **genes fragmentados**. Estas secuencias de DNA que no están representadas en el producto final del mRNA también se denominan **intrones** («int» por intercaladas), y las conservadas y expresadas **exones** («ex» por expresadas). El corte y empalme implica la eliminación de las secuencias ribonucleotídicas presentes en los intrones como resultado de un proceso de escisión, seguido de la unión de los exones.

Pronto se hicieron descubrimientos similares en diversos eucariotas. Dos enfoques han sido los más fructíferos. El primero comprende la hibridación molecular de mRNA maduro, purificado y funcional, con el DNA que contiene los genes que especifican el mensaje. Cuando se produce hibridación entre ácidos nucleicos que no son exactamente complementarios, se producen **heterodúplex**, en los que los intrones, presentes en el DNA pero ausentes del mRNA, forman lazos y permanecen sin emparejar. Como se muestra la Figura 13.11, estas estructuras pueden visualizarse con un microscopio electrónico. El heterodúplex de la figura contiene siete lazos (A-G), que representan siete intrones cuyas secuencias están presentes en el DNA pero no en el mRNA final.



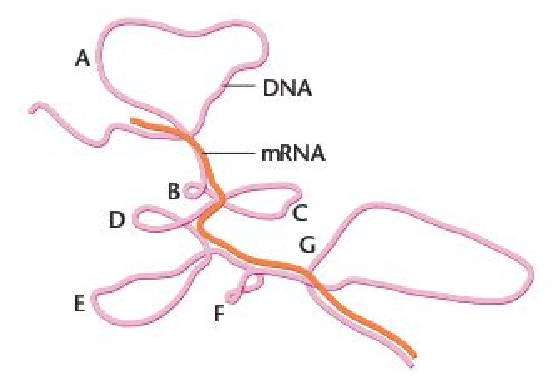


FIGURA 13.11 Micrografía electrónica y dibujo interpretativo de una molécula híbrida (un heterodúplex) formada entre la cadena de DNA molde del gen de la ovoalbúmina de pollo y el mRNA maduro de la ovoalbúmina. Los siete intrones en el DNA, A-G, producen lazos no emparejados.

El segundo enfoque proporciona una información más específica (Figura 13.12). Comprende la comparación de las secuencias nucleotídicas del DNA con las del mRNA, y su correlación con las secuencias aminoacídicas. Este enfoque permite la identificación precisa de las secuencias intercaladas.

Hasta ahora, se ha demostrado que la mayor parte de los genes eucarióticos contiene intrones. Uno de los primeros en identificarse fue el **gen de la beta-globina** de ratón y de conejo, estudiado independientemente por Philip Leder y Richard Flavell. El gen del ratón tiene un intrón de 550 nucleótidos, que empieza inmediatamente después del codón que especifica el aminoácido 104. En el conejo hay un intrón de 580 pares de bases cerca del codón del aminoácido 110. Además, en ambos genes hay un intrón anterior de unos 120 nucleótidos. Se han encontrado intrones similares en el gen de la beta-globina en todos los mamíferos examinados.

El **gen de la ovoalbúmina** de gallina ha sido extensamente caracterizado por Bert O'Malley en los Estados Unidos y por Pierre Chambon en Francia. Como se muestra en la Figura 13.12, el gen contiene siete intrones, y la mayoría de su secuencia de DNA es «silenciosa», estando compuesta de intrones. El transcrito de RNA inicial es casi tres veces más largo que el mRNA maduro. Compare la información del gen de la ovoalbúmina que se presenta en las Figuras 13.11 y 13.12. ¿Puede encajar los lazos no emparejados de la Figura 13.11 con la secuencia de intrones especificada en la Figura 13.12?

Pocos genes eucarióticos parecen no tener intrones. Un ejemplo extremo del número de intrones en un solo gen es el encontrado en el gen que codifica una de las subunidades del colágeno, la principal proteína del tejido conectivo de los vertebrados. El gen *colágeno pro-a-2(1)* contiene 50 intrones. La precisión con que el corte y empalme se produce debe ser extraordinaria para no introducir errores en el mRNA maduro. También destaca la comparación del tamaño de los genes con el tamaño del mRNA final, cuando los intrones has sido eliminados. Como se muestra en la Tabla 13.8, sólo el 15 por ciento del gen del colágeno está formado por exones que fi-

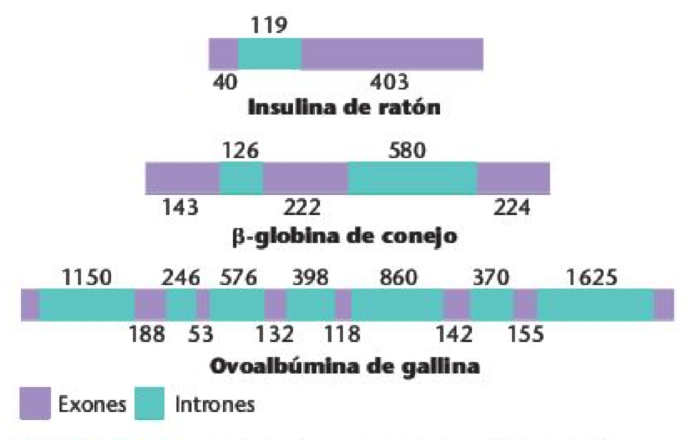


FIGURA 13.12 Secuencias intercaladas en diversos genes eucarióticos. Los números indican el número de los nucleótidos de las distintas regiones intrónicas y exónicas.

TABLA 13.8 COMPARACIÓN DEL TAMAÑO DE GENES HUMANOS CON EL DE SU mRNA Y EL NÚMERO DE INTRONES QUE CONTIENEN

Gen	Tamaño del gen (kb)	Tamaño del mRNA (kb)	Número de intrones
Insulina	1,7	0,4	2
Colágeno [*pro*-α-2(1)]	38,0	5,0	50
Albúmina	25,0	2,1	14
Fenilalanina hidroxilasa	90,0	2,4	12
Distrofina	2.000,0	17,0	50

nalmente aparecerán en el mRNA. Otras proteínas todavía muestran comparaciones más extremas. Sólo el 8 por ciento del gen de la albúmina permanece para ser traducido, y en el gen más grande conocido en los humanos, el de la distrofina (cuyo producto proteico está ausente en la distrofia muscular de Duchenne), sólo el 1 por ciento permanece en el mRNA. En la Tabla 13.8 se comparan otros genes humanos.

Si bien la inmensa mayoría de genes eucarióticos examinados hasta la actualidad contiene intrones, hay varias excepciones. En particular, los que codifican las histonas y el interferón parecen no contener intrones. No está claro por qué o cómo los genes que codifican estas moléculas se han mantenido, a lo largo de la evolución, sin adquirir la información ajena característica de la mayoría de los otros genes.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que los genes eucarióticos contienen secuencias no codificantes que deben ser eliminadas del intermediario de RNA antes de ser traducido en proteínas?

Los mecanismos de corte y empalme: RNA autocatalíticos

El descubrimiento de los genes fragmentados condujo a intensas investigaciones para aclarar los mecanismos por los que se cortan los intrones de RNA y se empalman los exones, habiéndose realizado muchos progresos. Curiosamente, parece que existen diferentes mecanismos para los diferentes tipos de RNA y para los RNA producidos en mitocondrias y cloroplastos. También se ha encontrado corte y empalme durante la maduración de los tRNA en procariotas. Vamos a ver con detalle el corte y empalme en los eucariotas.

Basándose en los mecanismos de corte y empalme, hay varios grupos de intrones. En el grupo I, que incluye los que forman parte de los transcritos primarios de los rRNA, no se precisan componentes adicionales para la escisión del intrón; el intrón es por sí mismo la fuente de la actividad enzimática necesaria para su propia eliminación. Este sorprendente descubrimiento, que contradijo las expectativas, fue realizado en 1982 por Thomas Cech y sus colaboradores al estudiar el protozoo ciliado *Tetrahymena*. Como reflejo de sus propiedades autocatalíticas, los RNA que pueden cortarse y empalmarse por sí mismos son a veces denominados **ribozimas**.

En la Figura 13.13 se muestra el **proceso de autoescisión**. Químicamente, se producen dos reacciones nucleofílicas (denominadas reacciones de transesterificación), la primera de las cuales incluye una interacción entre una guanosina, que actúa de cofactor en la reacción, y el transcrito primario [Figura 13.13(a)]. Se transfiere el grupo 3′-OH de la guanosina al nucleótido adyacente al extremo 5′ del intrón. La segunda reacción implica la interacción del grupo OH recién adquirido a la izquierda del exón y el nucleótido del extremo 3′ del intrón [Figura 13.13(b) y (c)]. Se corta y elimina el intrón y se empal-

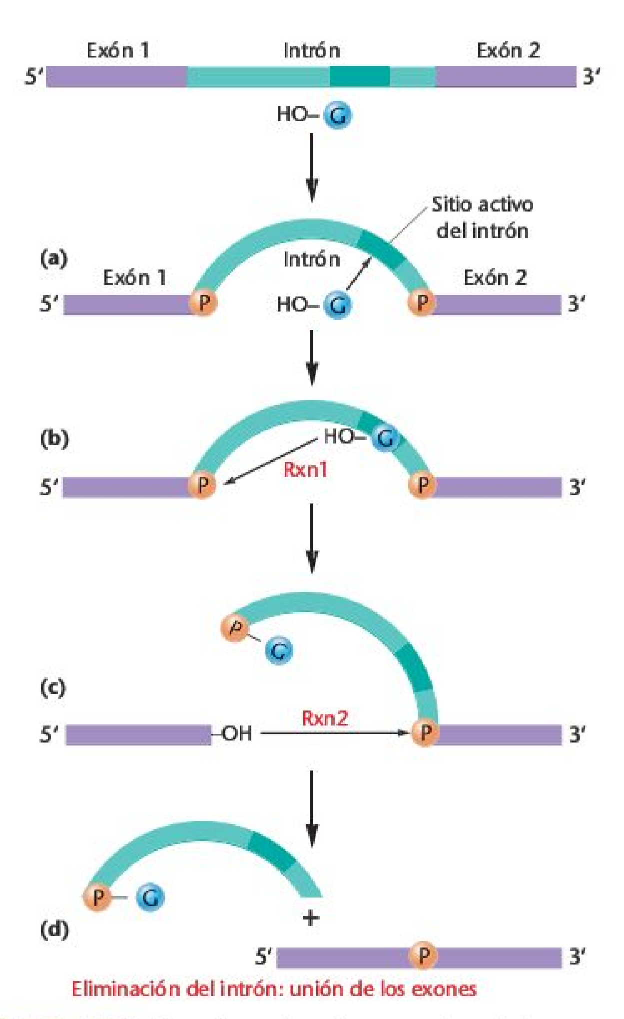


FIGURA 13.13 Mecanismo de corte y empalme de los intrones del grupo I eliminados del transcrito primario del rRNA. El proceso es una autoescisión que implica dos reacciones de transesterificación.

man los dos exones, dando lugar al RNA cortado y empalmado [Figura 13.13(d)].

Actualmente se sabe que la autoescisión de los intrones del grupo I también se produce en pre-rRNA de otros protozoos. La autoescisión también parece controlar la eliminación de los intrones presenten en los transcritos primarios de mRNA y tRNA producidos en las mitocondrias y en los cloroplastos. Estos intrones se denominan de tipo II. Como en las moléculas del tipo I, el corte y empalme implica dos reacciones autocatalíticas que conducen a la escisión de los intrones. Sin embargo, la guanosina no actúa de cofactor.

Los mecanismos de corte y empalme: el spliceosoma

Los intrones son, por supuesto, el principal componente de los transcritos de pre-mRNA procedentes del núcleo. Los intrones del mRNA proveniente del núcleo, comparados con los otros RNA tratados hasta ahora, pueden ser mucho más largos —de hasta 20.000 nucleótidos— y más abundantes. Su eliminación parece requerir mecanismos mucho más complejos.

El modelo que se esquematiza en la Figura 13.14 muestra la eliminación de un intrón. En primer lugar, la secuencia nucleotídica en torno a este tipo de intrones es a menudo similar. Muchos empiezan con una secuencia dinucleotídica GU en su extremo 5′, denominada secuencia donadora, y terminan con un dinucleótido AG en el extremo 3′, denominada secuencia aceptora. Éstas, junto a otras secuencias consenso compartidas por los intrones, atraen moléculas específicas que forman un complejo molecular esencial para el corte y empalme. Este complejo, denominado ***spliceosoma***[4], se ha identificado en extractos de levadura y en células de mamífero. Es muy grande, de 40S en levaduras y 60S en mamíferos. El componente más importante de los spliceosomas es, quizás, un tipo especial de **RNA nucleares pequeños (snRNA)**. Estos RNA tienen normalmente de 100 a 250 nucleótidos o menos de longitud, y a menudo forman complejos con proteínas para formar **ribonucleoproteínas nucleares pequeñas** (**snRNP**, del inglés *small nuclear ribonucleoproteins* —o ***snurps***[5]). Sólo están presentes en el núcleo. Puesto que son ricos en residuos de uridina, los snRNA se designan arbitrariamente como U1, U2, ..., U6.

El snRNA U1 tiene una secuencia nucleotídica que es complementaria a la del extremo donador 5′ del intrón. El emparejamiento de bases que resulta de esta complementariedad promueve la unión que representa el primer paso en la formación del spliceosoma. Después de la adición de los otros *snurps* (U2, U4, U5, U6), empieza el corte y empalme. Como en el corte y empalme de los intrones del grupo I, hay dos reacciones de transesterificación implicadas. La primera incluye al grupo 2′-OH de un residuo de adenina (A) presente en una región del intrón denominada **punto de ramificación**. El residuo A ataca el sitio 5′ y corta la cadena de RNA. El siguiente paso, que implica otros diversos *snurps*, se forma una estructura intermedia y se

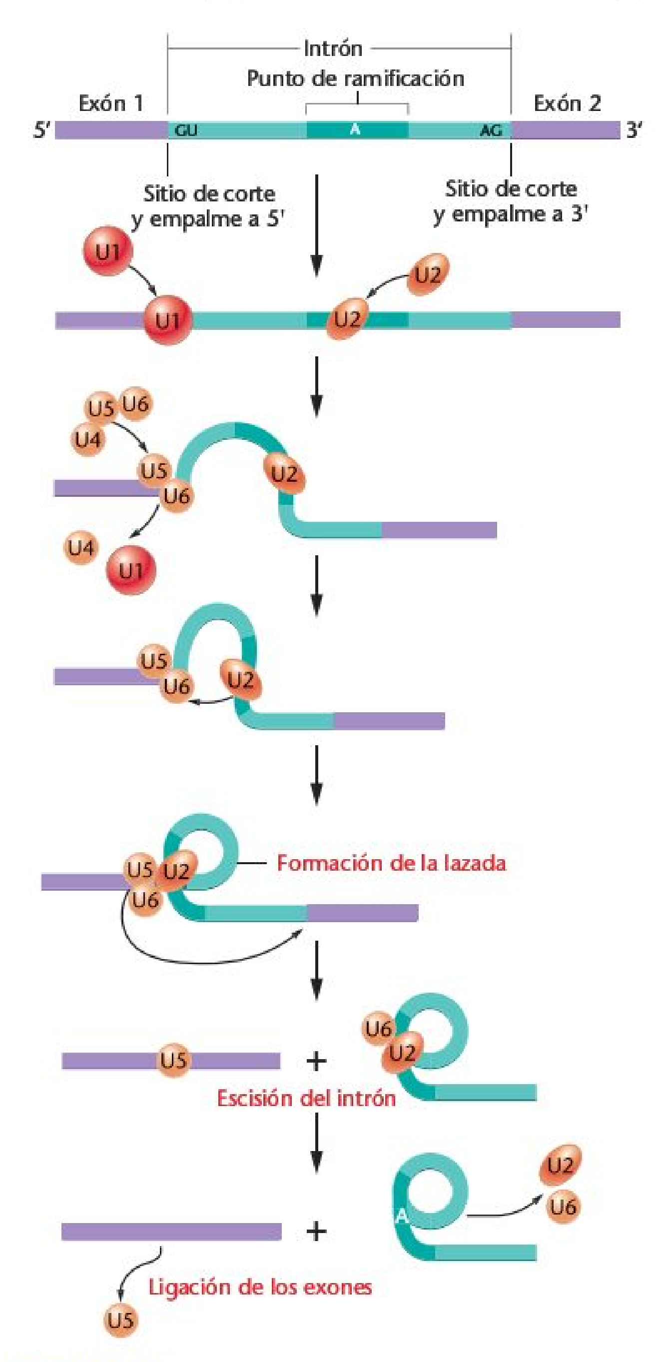


FIGURA 13.14 Mecanismo de corte y empalme de intrones eliminados del pre-mRNA. La escisión depende de diversos snRNA (U1, U2, . . . , U6) que se combinan con proteínas para formar snRNP (*snurps*), que forman parte de la gran estructura conocida como *spliceosoma*. La estructura de lazada del estadio intermedio es característica de este mecanismo.

[4] *Nota del traductor:* aunque la palabra inglesa *splicing* suele traducirse como «reacción de corte y empalme», el complejo implicado en esta reacción suele denominarse según la raíz inglesa, quedando como *spliceosoma*.

[5] *Nota del traductor:* la designación de *snurp* proviene de leer el acrónimo snRNP.

produce la segunda reacción, que une el extremo 5′ cortado del intrón a A. Esto forma una característica estructura de «lazada» denominada lariada, que contiene el intrón escindido. Entonces se unen los exones y se liberan los *snurps*.

El procesamiento que se produce en la reacción de corte y empalme representa un paso de regulación potencial durante la expresión génica. Por ejemplo, se conocen varios casos en los que intrones que hay en los pre-mRNA *derivados de un mismo gen* son cortados y empalmados *de más de una manera diferente*, produciendo así diferentes colecciones de exones en el mRNA maduro. Este proceso, conocido como **corte y empalme alternativo** (o ***splicing* alternativo**) produce un grupo de mRNA que, tras la traducción, da por resultado una serie de proteínas relacionadas denominadas **isoformas**. Se están encontrando un número creciente de ejemplos en organismos que van de los virus a *Drosophila* y a la especie humana. El corte y empalme alternativo de pre-mRNA proporciona la base para producir proteínas relacionadas a partir de un solo gen. Volveremos a tratar este tema durante la discusión de la regulación de la expresión génica en eucariotas (véase el Capítulo 17).

Edición del RNA

A finales de la década de los 80, se descubrió otro tipo más de procesamiento postranscripcional del RNA. En este caso, la secuencia nucleotídica del pre-mRNA cambia realmente antes de la traducción. En esta forma de procesamiento, denominada **edición del RNA**, se cambia realmente la secuencia ribonucleotídica del pre-mRNA antes de la traducción. El resultado es que la secuencia de ribonucleótidos del RNA maduro difiere de la secuencia codificada en los exones del DNA del que se transcribió.

Si bien hay numerosas variaciones de edición de RNA, los dos tipos principales estudiados inicialmente son la **edición por sustitución**, en la que se alteran las identidades de nucleótidos concretos, y la **edición por inserción/deleción**, en la que se añaden o eliminan nucleótidos al número total de bases. La edición por sustitución se utiliza en algunos RNA eucarióticos que vienen del núcleo y es muy corriente en RNA transcrito en mitocondrias y cloroplastos de plantas. *Physarum polycephalum*, un moho, utiliza tanto la edición por sustitución como la edición por inserción/deleción para sus RNA mitocondriales.

Trypanosoma, un parásito que provoca la enfermedad africana del sueño, y otros parásitos relacionados, utilizan una vasta edición por inserción/deleción en los RNA mitocondriales. El número de uridinas que se añade a un transcrito concreto pueden llegar a ser de más del 60 por ciento de la secuencia codificante, normalmente formando el codón de iniciación y poniendo el resto de la secuencia en la fase de lectura adecuada. El **gRNA (RNA guía)** dirige la edición por inserción/deleción en tripanosoma, y se transcribe a partir del propio genoma mitocondrial. Estos pequeños RNA son complementarios a la región editada del mRNA editado final. Se emparejan con el mRNA preeditado para dirigir la maquinaria de la edición y hacer los cambios correctos.

Los ejemplos mejor estudiados de edición por substitución se producen en transcritos de mRNA codificados por el genoma nuclear en mamíferos. La apolipoproteína B (apo B) presenta una forma larga y una forma corta, aunque un único gen codifica ambas proteínas. En las células intestinales de humanos, el mRNA de Apo B se edita mediante un único cambio de C a U, que convierte un codón CAA de glutamina en un codón UAA de terminación de la traducción. La edición la realiza un complejo de proteínas que se une a una «secuencia de atraque» del transcrito de mRNA justo al lado corriente abajo del sitio de edición. Un segundo sistema, la síntesis de las subunidades que forman los canales del receptor de glutamato (GluR) en tejido cerebral de mamífero, también está afectado por la edición de RNA. En este caso, se produce la edición de adenosina (A) a inosina (I) en el pre-mRNA antes de su traducción, durante la que I se lee como guanosina (G). Se cree que las enzimas producidas por la familia de tres genes *ADAR* (*adenosina RNA desaminasa)* es la responsable de la edición en diversos sitios de las subunidades del canal de glutamato. Apareamientos intrón-exón de los transcritos de mRNA de GluR proporcionan los RNAs de doble cadena que precisan las enzimas *ADAR* para realizar la edición. Estos cambios alteran los parámetros fisiológicos del receptor (permeabilidad del soluto y tiempo de respuesta de desensibilización) que contiene las subunidades «editadas».

La importancia de la edición como consecuencia de la actuación de las enzimas *ADAR* se hace más evidente cuando se examinan situaciones en las que estas enzimas han perdido su capacidad funcional como consecuencia de una mutación. En diversas investigaciones se ha demostrado que la pérdida de función es letal en ratones. En uno de los estudios, los embriones heterocigotos para el gen *ADAR1* murieron durante el desarrollo embrionario como consecuencia de defectos en el sistema hematopoiético. En otro trabajo, ratones con dos copias defectivas de *ADAR2* tienen un desarrollo normal, pero son propensos a sufrir ataques epilépticos y mueren durante el destete. Sus tejidos contienen la versión sin editar de uno de los productos GluR. Se cree que el defecto que los conduce a la muerte se encuentra en el cerebro. Los heterocigotos para la mutación son normales.

Descubrimientos como estos en mamíferos han probado que la edición de RNA proporciona otro importante mecanismo de modificación postranscripcional, y que este proceso no está restringido a genomas pequeños o que se reproducen asexualmente, como el de las mitocondrias. Desde su descubrimiento, cada año se descubren nuevos ejemplos de edición del RNA, y es muy probable que esta tendencia continúe. Además, el proceso tiene implicaciones importantes en la regulación de la expresión genética.

13.13 La transcripción se ha visualizado mediante microscopía electrónica

Terminaremos este capítulo presentando una sorprendente demostración visual del proceso de transcripción basado en los es-

tudios de microscopia electrónica realizados por Oscar Miller, Jr., Barbara Hamkalo y Charles Thomas. Su trabajo combinado ha capturado el proceso de transcripción en procariotas y en eucariotas. La Figura 13.15 muestra micrografías y su interpretación esquemática de dos organismos, la bacteria *E. coli* y el tritón *Notophthalamus viridescens*. En ambos casos se ven cadenas múltiples de RNA emanando de diferentes puntos a lo largo del DNA en posición central. Se producen muchas cadenas de RNA debido a que se están produciendo numerosos sucesos de transcripción simultáneamente en un mismo gen. Las cadenas de RNA progresivamente más largas se encuentran corriente abajo, más lejos del punto de inicio de transcripción, mientras que las cadenas más cortas están más cerca del punto de inicio.

El análisis de la micrografía de *E. coli* muestra una imagen interesante [Figura 13.15(a)]. Debido a que los procariotas carecen de núcleo, los ribosomas citoplasmáticos no están separados físicamente del cromosoma. En consecuencia, los ribosomas pueden unirse a moléculas de mRNA *parcialmente* transcritas e iniciar la traducción. Las cadenas de RNA más largas permiten ver un mayor número de ribosomas. En el ejemplo del tritón [Figura 13.15(b)], el segmento de DNA procede de oocitos, que se sabe producen una gran cantidad de rRNA, uno e los componentes principales de los ribosomas. Para llevar a cabo esta síntesis, en el oocito se replican muchas veces los genes específicos para el **RNA ribosómico (rDNA)**, en un proceso denominado **amplificación génica**. La micrografía muestra varios de estos genes, experimentando cada uno sucesos simultáneos de transcripción. Al moverse la enzima a lo largo de la cadena de DNA se producen, para cada gen de rRNA, cadenas incompletas de moléculas de rRNA, cada vez más largas. La visualización de la transcripción confirma nuestras expectativas basadas en el análisis bioquímico de este proceso.

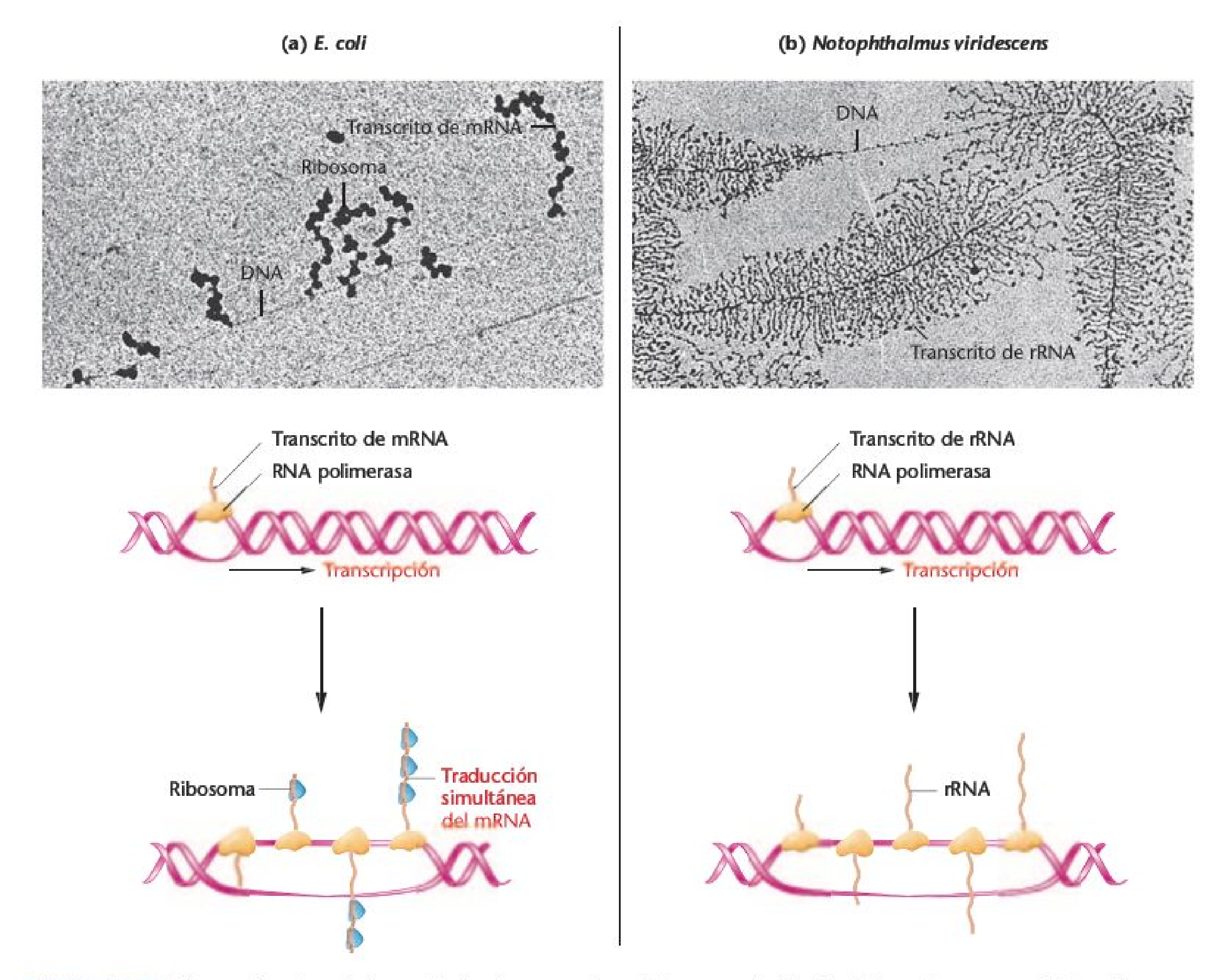


FIGURA 13.15 Micrografías electrónicas y dibujos interpretativos de la transcripción simultánea de genes en (a) *E. coli* y (b) *Notophthalmus (Triturus) viridescens*. *(a) O.L. Miller, Jr. Barbara A. Hamkalo, C.A. Thomas, Jr. Science 169:392–395, 1970 de la American Association for the Advancement of Science. F:2.*



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Oligonucleótidos antisentido: atacando el mensajero

A menudo, las quimioterapias normales utilizadas para tratar enfermedades como el cáncer y el virus del SIDA (HIV) tienen efectos secundarios tóxicos. Las drogas terapéuticas convencionales se dirigen tanto a las células normales como a las enfermas; las células enfermas o infectadas sólo son ligeramente más sensibles que las células normales del paciente. Los científicos han deseado, durante mucho tiempo, disponer de un proyectil mágico que pudiese perseguir y destruir los virus o las células cancerígenas, dejando las células normales vivas y sanas. Durante la última década, ha surgido un candidato a proyectil mágico especialmente prometedor —el **oligonucleótido antisentido.**

Las terapias antisentido han surgido de la comprensión de la biología molecular de la expresión génica. La expresión génica es un proceso en dos etapas. Primero, la cadena molde de la molécula de DNA dúplex se copia en un RNA mensajero (mRNA) de cadena sencilla. Segundo, el mRNA se acompleja a los ribosomas, y su información genética se traduce a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Normalmente, la información genética de una de las cadenas del DNA dúplex se transcribe a RNA, y el RNA resultante se conoce como *RNA con sentido*. Sin embargo, a veces es posible que la otra cadena de DNA se copie a RNA. El RNA producido por la transcripción de la cadena «errónea» se denomina *RNA antisentido*. Igual que si fuesen cadenas de DNA complementarias, las cadenas complementarias de RNA pueden formar moléculas de doble cadena.

La formación de estructuras dúplex entre moléculas de RNA con sentido y de RNA antisentido puede afectar al RNA con sentido al menos de dos maneras diferentes. La unión del RNA antisentido al RNA con sentido puede bloquear físicamente la unión del ribosoma o la elongación, inhibiendo por lo tanto la traducción. Su unión también puede disparar la degradación del RNA con sentido puesto que determinadas ribonucleasas intracelulares atacan las moléculas de RNA dúplex. En ambos casos se bloquea la expresión génica.

Lo que hace tan interesante el enfoque antisentido es su potencial especificidad. Los científicos pueden diseñar moléculas de RNA (o de DNA) antisentido de secuencias nucleotídicas conocidas, y luego pueden sintetizar grandes cantidades de ellas *in vitro*. Generalmente se usan oligonucleótidos de hasta 20 nucleótidos. Teóricamente es posible tratar células con estos oligonucleótidos antisentido sintéticos, que los oligonucleótidos entren en las células y se unan a los mRNA diana específicos, y que desconecten la síntesis de una proteína específica. Si esa proteína es necesaria para la reproducción del virus o para el crecimiento de la célula cancerígena (pero no lo es para las células normales), el oligonucleótido antisentido sólo tendrá efectos terapéuticos.

En los últimos años, los ensayos de laboratorio de los medicamentos antisentido han sido tan prometedores que actualmente se están realizando muchos ensayos clínicos. Además, en los EEUU ya se ha autorizado la venta de un medicamento antisentido (Vitravene©, de ISIS Pharmaceuticals y CIBA Vision Corp.). Vitavene es un nucleótido antisentido que se utiliza para tratar la retinitis inducida por citomegalovirus en pacientes de SIDA. El citomegalovirus (CMV) es un virus común que infecta a muchas personas. Aunque causa pocos problemas a las personas con un sistema inmunitario normal, puede provocar síntomas graves a las personas con un sistema inmunitario alterado (como en el SIDA). Hasta el 40 por ciento de los pacientes de SIDA desarrollan retinitis o ceguera como consecuencia de una infección ocular de CMV. Los ensayos clínicos indican que la introducción de oligonucleótidos antisentido de CMV en los ojos de pacientes de SIDA afectados de retinitis inducida por este virus retrasa de manera significativa la progresión de esta enfermedad en comparación con los grupos control no tratados. Los estudios de laboratorio sugieren que los oligonucleótidos antisentido pueden disparar la destrucción del mRNA de CMV e interferir con la adsorción de este virus en la superficie de las células huésped.

Los oligonucleótidos antisentido también pueden actuar como medicamentos antiinflamatorios. Actualmente se están realizando ensayos clínicos para probar compuestos antisentido en el tratamiento del asma, artritis reumatoide, soriasis, colitis ulcerante y el rechazo en los transplantes. Un oligonucleótido antisentido interesante (actualmente en ensayo clínico dirigido por ISIS y Boehringer Ingelheim) se une al mRNA que codifica ICAM-1, una glicoproteína de superficie celular que contribuye a la activación del sistema inmunitario y de las células inflamatorias. Normalmente se encuentra sobreexpresado en los tejidos corporales que muestran una respuesta inflamatoria extrema. Los resultados de un ensayo clínico reciente sugieren que el ICAM-1 antisentido puede ser un tratamiento efectivo para la enfermedad de Crohn, crónica y que provoca debilidad, un tipo de enfermedad inflamatoria que afecta unas 200.000 personas en los EEUU. En un ensayo clínico, a casi la mitad de los pacientes con enfermedad de Crohn les remitió esta enfermedad tras ser tratados con ICAM-1 antisentido, lo que no sucedió a ninguna persona del grupo placebo. En este ensayo, los medicamentos ICAM-1 antisentido parecieron ser bien tolerados y seguros.

Actualmente se están realizando algunos ensayos clínicos para probar oligonucleótidos antisentido en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Estos oligonucleótidos se diseñan para reducir la síntesis de proteínas que se encuentran sobreexpresadas en células cancerígenas o que presentan formas mutantes. Estos medicamentos se evaluarán como tratamientos para tumores de ovario, próstata, mama, colon y pulmón. Otros medicamentos antisentido en trámite van dirigidos a atacar los virus de la hepatitis B y C, del papiloma humano y del SIDA. Si las terapias antisentido superan el escrutinio de estos ensayos clínicos, ciertamente podríamos haber adquirido un proyectil molecular mágico para ser usado en la batalla contra muchas enfermedades.

Más recientemente ha surgido otra tecnología de silenciamiento génico que tam-

bién se basa en el principio antisentido. Esta tecnología, denominada interferencia del RNA (RNAi, del inglés RNA interference), utiliza moléculas cortas de RNA de doble cadena (aproximadamente de 20 nucleótidos de longitud) denominadas RNA de interferencia cortos (siRNA, del inglés small interfering RNA) para apuntar a moléculas de mRNA específicas dentro de las células. Una cadena del RNA corto reconoce una secuencia del mRNA, lo que conduce a la degradación o al silenciamiento del mRNA. Aunque el RNAi es muy eficiente *in vitro* y se usa en investigación de laboratorio, la aplicación de esta tecnología a las enfermedades humanas está menos avanzada que la basada en oligonucleótidos antisentido. En los Capítulos 17 y 21 se trata el RNAi más detalladamente.

Bibliografía

Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. 2003. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nature Revs. Molec. Cell Biol.* 4:457–67.

Nyce, J.W., and Metzger, W.J. 1997. DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature* 385:721–25.

Roush, W. 1997. Antisense aims for a renaissance. *Science* 276:1192–93.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. El código genético, almacenado en el DNA, se copia a RNA, que se utiliza para dirigir la síntesis de cadenas polipeptídicas. Es degenerado, no contiene ambigüedades, no es solapante y no tiene signos de puntuación internos.
2. El código genético completo, determinado mediante varios enfoques experimentales, muestra que de los 64 codones posibles, 61 codifican los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas, mientras que tres tripletes terminan la traducción. Uno de estos 61 codones es el de iniciación, y especifica metionina.
3. El patrón observado de degeneración implica, a menudo, sólo a la tercera letra de un grupo de tripletes, y llevó a Francis Crick a proponer la «hipótesis del tambaleo».
4. La confirmación del código genético, incluyendo los codones de iniciación y terminación, se obtuvo comparando la secuencia nucleotídica completa del fago MS2 con la secuencia aminoacídica de las correspondientes proteínas. Otros descubrimientos apoyan la creencia de que, salvo excepciones minoritarias, el código genético es universal para todos los organismos.
5. En algunos bacteriófagos puede haber múltiples sitios de iniciación durante la traducción del RNA, dando por resultado múltiples fases de lectura y genes solapados.
6. La transcripción, el paso inicial de la expresión génica, describe la síntesis de una cadena de RNA, complementaria a un DNA molde, bajo la dirección de la RNA polimerasa.
7. El proceso de transcripción, como el de replicación del DNA, puede dividirse en los estadios de iniciación, elongación y terminación. También como durante la replicación del DNA, este proceso se basa en las afinidades de emparejamiento de bases entre nucleótidos complementarios.
8. La iniciación de la transcripción depende de una región corriente arriba (5′) denominada promotor, que representa el sitio de unión inicial de la RNA polimerasa. Los promotores contienen secuencias específicas de DNA, como la caja TATA, que son esenciales para la unión de esta enzima.
9. La transcripción es más compleja en eucariotas que en procariotas. El transcrito primario es un pre-mRNA que debe modificarse de varias maneras antes de que pueda traducirse eficientemente. Este procesamiento, que produce el mRNA maduro, incluye la adición de una caperuza de 7mG y de una cola de poli-A, y la eliminación, por reacción de corte y empalme, de las secuencias intercaladas o intrones. Algunos sistemas también realizan edición del pre-mRNA antes de la traducción.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Si para formar la estructura del DNA la evolución se hubiese fijado en 6 bases (3 pares de bases complementarias) en lugar de en 4 bases, calcule cuántos codones de tripletes codificantes diferentes habría. ¿Podrían 6 bases acomodar un código de dos letras, suponiendo la existencia de 20 aminoácidos y de codones de iniciación y de terminación?

Solución: Seis elementos tomados de tres en tres producen $(6)^3$ o 216 codones de tripletes. Si el código fuese un doblete, habría $(6)^2$ o 36 codones de dos letras, suficientes para acomodar 20 aminoácidos y la puntuación de inicio y fin.

2. Si en un experimento de heteropolímeros se utiliza 1/2C:1/4A:1/4G, ¿cuántos codones diferentes se producirán en la molécula sintética de RNA? ¿Con qué frecuencia aparecerá el codón más frecuente?

Solución: Se producirán $(3)^3$ o 27 codones. El más frecuente será CCC, que se presentará $(1/2)^3$ o 1/8 de las veces.

3. En un experimento típico de copolímeros, en que se va repitiendo UUAC, ¿cuántos codones diferentes habrá en el RNA sintético, y cuántos aminoácidos diferentes se producirán en el polipéptido cuando se traduzca el RNA? Consulte la Figura 13.7.

Solución: En el RNA sintético se irán repitiendo cuatro codones —UUA, UAC, ACU y CUU—. Como UUA y CUU codifican leucina, y ACU y UAC codifican treonina y tirosina, respectivamente, los polipéptidos que se sinteticen dirigidos por este RNA contendrán tres aminoácidos diferentes en la secuencia leu-leu-thr-tyr, que se irá repitiendo.

4. La actinomicina D inhibe la síntesis de RNA dependiente de DNA. Se añade este antibiótico a un cultivo bacteriano en el que se está siguiendo una proteína específica. Comparándolo con un cultivo control, la traducción de la proteína decae por un periodo de 20 minutos, hasta que no se fabrica más proteína. Interprete estos resultados.

Solución: El mRNA, que es la base para la traducción de la proteína, tiene una vida media de 20 minutos. Cuando se añade la actinomicina D, se inhibe la transcripción y no se sintetiza nuevo mRNA. Los que ya están presentes mantienen la traducción de la proteína durante 20 minutos.

5. Se analizó la composición de bases del DNA y del RNA de una bacteria hipotética, obteniéndose los siguientes resultados:

	(A + G)/(T + C)	(A + T)/(C + G)	(A + G)/(U + C)	(A + U)/(C + G)
DNA	1,0	1,2		
RNA			1,3	1,2

Basándose en estos datos, ¿qué conclusiones puede sacar del DNA y del RNA de este organismo? ¿Son estos datos compatibles con el modelo de DNA de Watson-Crick? ¿El DNA es de cadena sencilla o doble, o no se puede deducir? Si suponemos que se ha transcrito el DNA en toda su longitud, ¿sugieren estos datos que el RNA proviene de la transcripción de una o de las dos cadenas de DNA, o no lo podemos deducir con estos datos?

Solución: Este problema es un ejercicio teórico diseñado para que observe las consecuencias de la complementariedad de bases y cómo ésta afecta a la composición del DNA y del RNA. La composición de bases del DNA es compatible con el modelo de la doble hélice de Watson-Crick. En una doble hélice, esperamos que A + G sea igual a T + C (el número de purinas debería ser igual al de pirimidinas). En este caso hay, además, una preponderancia de pares de bases A = T (120 pares A = T por cada 100 pares G ≡ C).

Con lo que sabemos del RNA, no hay ninguna razón para creer que sea de doble cadena, pero si lo fuese, esperaríamos entonces que A = U y C ≡ G. Si fuese así, entonces (A + G)/(U + C) = 1. Como esta relación no es igual a 1, podemos concluir que el RNA no es de doble cadena.

Si se transcribe todo el DNA, tanto de una como de las dos cadenas, la relación (A + U)/(C + G) en el RNA debería ser 1,2, siendo tal como se predice. Obsérvese que esta relación no cambiará, independientemente de si se transcribe una o ambas cadenas. Esto de debe a que, por ejemplo, si se transcriben ambas cadenas, para cada par A = T del DNA la transcripción del RNA producirá una A y una U. Si se transcribe sólo una de ellas, la transcripción producirá una A *o* una U. En cualquier caso, la relación (A + U)/(C + G) del RNA será el reflejo de la relación (A + T)/(C + C) del DNA del que se ha transcrito. Para probarlo, dibuje una molécula de DNA con 12 pares A = T y 10 pares C ≡ G, y transcriba primero *ambas* cadenas. Luego transcriba *cualquiera* de las dos. Cuente las bases producidas en los RNA y calcule las relaciones. Así, con la relación (A + U)/(C + G) no podemos determinar si se ha transcrito una o las dos cadenas.

Sin embargo, si se transcriben las dos cadenas, la relación (A + G)/(U + C) debería ser igual a 1, y no lo es. Es igual a 1,3. Para verificar esta conclusión, analice los datos teóricos del dibujo anterior. Una explicación para la relación observada de 1,3 es que sólo se transcribe una de las dos cadenas. Si fuese así, la relación (A + G)/(U + C) reflejaría la proporción de pares (A + T) que son A y la proporción de pares G ≡ C que son G *en la cadena de DNA que se ha transcrito*. Otra explicación es que la transcripción se produce sólo en una cadena en cualquier punto dado (p.e., para un gen), y en la otra cadena para otros puntos (para otros genes).

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Las primeras propuestas sobre el código genético consideraban la posibilidad de que el DNA sirviese de molde para la síntesis de polipéptidos de forma directa (véase el artículo de Gamow, 1954, en Lecturas seleccionadas). En eucariotas, ¿qué dificultades tendría este sistema? ¿Qué observaciones y qué consideraciones teóricas dan argumentos en contra de esta propuesta?
2. En sus trabajos de mutaciones de cambio de fase, Crick, Barnett, Brenner y Watts-Tobin encontraron que cada 3(+) o 3(−) restauraban la fase de lectura correcta. Si el código fuese un sextuplete (que consistiese en 6 nucleótidos), ¿se restauraría la fase de lectura correcta con cualquiera de las combinaciones anteriores?
3. En un experimento de mezcla de copolímeros en que se utiliza la polinucleótido fosforilasa, se añadió 3/4G:1/4C para formar el mensaje sintético. Se determinó la composición aminoacídica de la proteína resultante:

Glicina	36/64	(56 %)
Alanina	12/64	(19 %)
Arginina	12/64	(19 %)
Prolina	4/64	(6 %)

Con esta información:
(a) Indique el porcentaje (o fracción) de veces que se encontrará en el mensaje cada uno de los posibles tripletes.
(b) Determine una composición de bases congruente para cada aminoácido encontrado.
(c) Considerando la hipótesis del tambaleo, prediga tantas asignaciones a tripletes específicos como sea posible.

4. Cuando se usan copolímeros repetidos para formar un mRNA sintético, los dinucleótidos producen un único tipo de polipéptido que contiene sólo dos tipos de aminoácidos. Por otro lado, usando una secuencia de trinucleótidos, se producen tres poli-

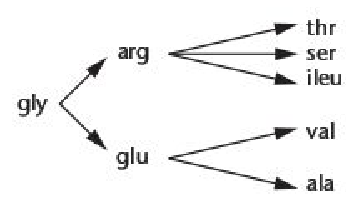
pétidos diferentes, cada uno formado por un solo aminoácido. ¿Por qué? ¿Qué se producirá si se utiliza un tetranucleótido repetido?

5. El mRNA formado por el tetranucleótido repetido UUAC incorpora sólo tres aminoácidos, mientras que la utilización del UAUC incorpora cuatro. ¿Por qué?
6. En experimentos en que se utilizan copolímeros repetidos, el AC... incorpora treonina e histidina, y el CAACAA... incorpora glutamina, asparragina, y treonina. ¿Qué triplete puede asignase con toda seguridad a la treonina?
7. En un experimento en que se utilizaron copolímeros repetidos (como se muestra en la Tabla 13.3), se obtuvieron los siguientes resultados:

Copolímeros	Codones producidos	Aminoácidos en el polipéptido
AG	AGA, GAG	Arg, Glu
AAG	AGA, AAG, GAA	Lys, Arg, Glu

Se sabe que AGG codifica arginina. Considerando la hipótesis del tambaleo, asigne el aminoácido correcto a los cuatro tripletes restantes.

8. En la técnica de unión al triplete, la radioactividad permanece en el filtro cuando el aminoácido que corresponde a dicho triplete está marcado. Explique los fundamentos de esta técnica.
9. Cuando se determinó la secuencia de aminoácidos de la insulina para diferentes organismos, se observaron algunas diferencias. Por ejemplo, en posiciones correspondientes de la proteína, la alanina estaba sustituida por la treonina, la serina por la glicina, y la valina por la isoleucina. Enumere los cambios de una base que podrían haber ocurrido en los codones del código genético para producir estos cambios de aminoácidos.
10. En estudios de la secuencia de aminoácidos de las formas silvestre y mutante de la triptófano sintetasa de *E. coli*, se observaron los siguientes cambios:



Establezca un conjunto de tripletes en los que el cambio de un único nucleótido produzca cada uno de los cambios de aminoácidos.

11. ¿Por qué la polinucleótido fosforilasa no sintetiza RNA *in vivo*?
12. Remítase a la Tabla 13.1. ¿Puede dar una hipótesis de por qué una mezcla de poli-U + poli-A no estimularía la incorporación de fenilalanina-^{14}C en la proteína?
13. Prediga la secuencia de aminoácidos que se produce durante la traducción de las siguientes secuencias teóricas de mRNA (observe que la segunda secuencia está formada a partir de la primera por deleción de un nucleótido):

Secuencia 1:	AUGCCGGAUUAUAGUUGA
Secuencia 2:	AUGCCGGAUUAAGUUGA

¿Qué tipo de mutación ha generado la secuencia 2?

14. Se aisló una molécula corta de RNA que mostraba cambio hipercrómico indicativo de estructura secundaria. Se determinó que la secuencia era

AGGCGCCGACUCUACU

(a) Proponga un modelo bidimensional para esta molécula.
(b) ¿Qué secuencia de DNA produciría esta molécula de RNA mediante transcripción?
(c) Si la molécula fuese un fragmento de tRNA que tuviese el anticodón CGA, ¿cuál sería el correspondiente codón?
(d) Si la molécula fuese parte interna de un mensaje, ¿qué secuencia aminoacídica daría por resultado después de la traducción? (Remítase a la Figura 13.7 para la tabla del código genético)

15. En la posición 210 de la enzima silvestre triptófano sintetasa de E. coli hay un residuo glicina. Si el codón que especifica glicina es GGA, ¿cuántas sustituciones de una sola base producirían sustitución de aminoácido en la posición 210? ¿Cuáles son? ¿Cuántas habrá si el codón silvestre es GGU?
16. Remítase a la Figura 13.7 para responder a esta pregunta:

(a) A continuación se muestra una secuencia teórica de un mRNA vírico:

5′-AUGCAUACCUAUGAGACCCUUGGA-3′

Suponiendo que pueda originarse de genes solapados, ¿cuántas secuencias polipeptídicas diferentes pueden producirse? ¿Cuáles son estas secuencias?

(b) Una mutación por sustitución de una base que altera la secuencia anterior (a) elimina la síntesis de todos los polipéptidos menos uno. A continuación se muestra la secuencia alterada:

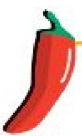
5′-AUGCAUACCUAUGUGACCCUUGGA-3′

Determine el porqué.

17. Muchas proteínas tienen más residuos leucina que histidina, y más residuos histidina que triptófano. Relacione el número de codones para estos tres aminoácidos con la anterior información.
18. Defina el proceso de transcripción. ¿En qué lugar del dogma central de la genética molecular encaja este proceso (El DNA hace el RNA, y éste la proteína)?
19. ¿Cuál fue la primera prueba de la existencia del mRNA?
20. Describa la estructura de la RNA polimerasa en bacterias. ¿Cuál es el núcleo enzimático? ¿Cuál es la función de la subunidad sigma?
21. Describa en un párrafo las reacciones químicas abreviadas que resumen la transcripción dirigida por la RNA polimerasa.
22. Enumere todos los constituyentes moleculares presentes en un polirribosoma funcional.
23. Las siguientes secuencias desoxirribonucleotídicas proceden de una cadena molde de DNA:

Secuencia 1:	5′-CTTTTTGCCAT-3′
Secuencia 2:	5′-ACATCAATAACT-3′
Secuencia 3:	5′-TACAAGGGTTCT-3′

(a) Determine la secuencia de mRNA de cada cadena que se derivaría de su transcripción.
(b) Utilizando la Figura 13.7, determine la secuencia aminoacídica codificada por estos mRNA.
(c) Para la Secuencia 1, ¿cuál es la secuencia de la cadena de DNA que no actúa de molde?



Problemas extra-picantes

24. En un experimento de mezcla de copolímeros se sintetizaron mensajeros con 4/5C:1/5A o 4/5A:1/5C. Estos mensajes produjeron proteínas con las siguientes composiciones de aminoácidos.

4/5C:1/5A		4/5A:1/5C	
Prolina	63,0 %	Prolina	3,5 %
Histidina	13,0 %	Histidina	3,0 %
Treonina	16,0 %	Treonina	16,6 %
Glutamina	3,0 %	Glutamina	13,0 %
Asparragina	3,0 %	Asparragina	13,0 %
Lisina	0,5 %	Lisina	50,0 %
	98,5 %		99,1 %

Utilizando estos datos, prediga la composición del triplete específica de cada aminoácido.

25. A continuación se muestran las secuencias aminoacídicas de las formas silvestre y mutante de una proteína corta. Utilice esta información para responder a las siguientes preguntas:

Silvestre:	mer-trp-tyr-arg-gly-ser-pro-thr
Mutante 1:	met-trp
Mutante 2:	met-trp-his-arg-gly-ser-pro-thr
Mutante 3:	met-cys-ile-val-val-val-gln-his

(a) Utilizando la Figura 13.7, determine el tipo de mutación que ha conducido a cada proteína alterada.
(b) Para cada proteína mutante, determine el cambio ribonucleotídico específico que llevó a su síntesis.
(c) El RNA silvestre está formado por nueve tripletes. ¿Cuál es la función del noveno triplete?
(d) De los ocho primeros tripletes silvestres, ¿cuál de ellos puede determinarse sin lugar a dudas, si es que puede determinarse alguno, utilizando el análisis de las proteínas mutantes? Explique por qué o por qué no en cada uno de los casos.
(e) Se aisló otra mutación (Mutante 4). Su secuencia aminoacídica no está cambiada, pero las células mutantes producen cantidades anormalmente bajas de la proteína silvestre. Prediga, tan específicamente como pueda, en que lugar del gen está la mutación.

26. El código genético es degenerado. Los aminoácidos son codificados por 1, 2, 3, 4 ó 6 codones de tripletes (véase la Figura 13.7). Una pregunta interesante es si la frecuencia de tripletes codificantes está relacionada con la frecuencia en que se encuentran los aminoácidos en las proteínas. Es decir, ¿el código genético está optimizado para el uso para el que se ha diseñado? A continuación se muestra una aproximación a la frecuencia de aparición de nueve aminoácidos en las proteínas de *E. coli*:

	Porcentaje
Met	2
Cys	2
Gln	5
Pro	5
Arg	5
Ile	6
Glu	7
Ala	8
Leu	10

(a) Determine cuántos tripletes codifican cada aminoácido.
(b) Diseñe un sistema para representar gráficamente los dos conjuntos de información (de datos).
(c) Analice sus datos para determinar qué correlaciones pueden extraerse, si las hay, entre la frecuencia relativa de los aminoácidos constituyentes de las proteínas y el número de codones para cada uno de ellos. Escriba un párrafo para exponer sus conclusiones específicas y generales.
(d) ¿Cuáles serían los siguientes pasos de su análisis si quisiese continuar el análisis de esta cuestión?

27. Como se describe en el Capítulo 12, los elementos *Alu* proliferan en el genoma humano por un proceso denominado retrotranscripción, en el que la secuencia de DNA *Alu* se transcribe a RNA, se copia a un DNA de doble cadena y se inserta en el genoma en un sitio alejado al de su *Alu* «progenitor».

Está claro que este proceso es extremadamente eficiente, puesto que las secuencias Alu han proliferado hasta unas 10^6 copias en el genoma humano! Esta eficiencia se debe en gran medida al hecho de que las secuencias *Alu*, como muchos RNA estructurales, llevan sus propias secuencias promotoras *dentro de la región transcrita del gen*, en vez de tenerlas a 5′ del sitio de inicio de transcripción.

Si las secuencias *Alu* llevasen los promotores corriente arriba del sitio de inicio de transcripción, de forma parecida a los genes que codifican proteínas, ¿qué ocurriría una vez se hubiesen transpuesto? ¿Sería capaz de proliferar una secuencia *Alu* retrotranspuesta? Explíquelo.

28. M. Klemke y sus colaboradores (2001. *EMBO J.* 20: 3849-60) descubrieron un interesante fenómeno de codificación en un exón de un gen de un receptor de una hormona en mamíferos, por el que dos proteínas diferentes (XLαs y ALEX) parecías ser producidas por el mismo exón. A continuación se muestra la secuencia de DNA del extremo 5′ del gen de rata. Las letras en minúscula representan la porción codificante inicial de la proteína XLαs, y las letras en mayúscula indican la porción donde se inicia la proteína ALEX. (Para simplificar, y para que se corresponda con el diccionario del código, se acostumbra a representar el segmento de DNA de la cadena acompañante no codificante, la que no actúa de molde.)

5′-gtcccaaccatgcccaccgatcttccgcctgcttctgaagATGCGGGCCCAG

(a) Convierta la secuencia de DNA no codificante en la secuencia codificante de RNA.
(b) Localice el codón de iniciación del segmento XLαs.
(c) Localice el codón de iniciación del segmento ALEX. ¿están en la misma pauta de lectura ambos codones de iniciación?
(d) Proporcione la secuencia aminoacídica de ambas secuencias codificantes. En la región de solapamiento, ¿son iguales las dos secuencias aminoacídicas?
(e) ¿Hay alguna ventaja evolutiva en tener la misma secuencia codificante de DNA para dos productos proteicos? ¿Hay alguna desventaja?

29. En este capítulo se ha introducido el concepto se secuencia consenso de DNA como aquellas secuencias que son similares

(homólogas) en genes diferentes de un mismo organismo o en genes de diferentes organismos. Los ejemplos propuestos son los de la caja Pribnow y la región −35 en procariotas, y la región de la caja TATA en eucariotas. El trabajo de Novitske y sus colaboradores (2002. *J. Virol.* 76:5435-51) indica que en la región promotora-intensificadora de 73 virus HIV-Tipo 1C aislados (el principal responsable de la epidemia de SIDA) se encuentra una secuencia consenso GGGNNNNNCC (en la que N es cualquier base nitrogenada) del factor de transcripción NF-κB, un motivo de actuación en *cis* que es crítico para iniciar la transcripción de HIV en los macrófagos humanos. Los autores dicen que el hallazgo de esta y otras secuencias conservadas puede ser valioso para diseñar una vacuna contra el SIDA. ¿Qué ventajas conferiría el hallazgo de secuencias consenso? ¿Qué inconvenientes?

30. En teoría, los oligodesoxirribonucleótidos antisentido (segmentos de DNA de cadena sencilla relativamente cortos, de 7 a 20 nucleótidos) pueden bloquear selectivamente genes causantes de enfermedades. Lo hacen apareándose con regiones complementarias de los transcritos de RNA, lo que inhibe su función. El híbrido DNA/RNA es reconocido por la RNasa H intracelular, que degrada la porción de RNA del híbrido. A menudo se han elegido genes responsables de cáncer como dianas potenciales de los medicamentos antisentido. Datos de Cho y sus colaboradores (2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 98: 9819-23), que se muestran a continuación, establecieron que en respuesta a una única población de desoxirribonucleótidos antisentido que apuntaban al mRNA de una quinasa específica de una línea celular de cáncer de próstata, hubo una respuesta diferencial de hasta 20 veces (en más y en menos) en la expresión de genes no relacionados (medido por la producción de mRNA).

Gen analizado	Cambio de expresión
Cadena ligera de la miosina	+14,4X
Receptor de la proteína G	+3,7X
Colágeno	−4,0X
Catalasa	+6,7X

(a) Haga un esquema de la acción intracelular de un oligodesoxirribonucleótido antisentido.
(b) Haga un esquema de la acción de la RNasa H.
(c) ¿Cuál puede ser la causa de la disminución de la expresión de genes no relacionados, como los del colágeno y la catalasa?
(d) ¿Cuál puede ser la causa del incremento de expresión de genes no relacionados, como los de la miosina y la proteína G?
(e) Con los datos que se le presentan, ¿qué inconvenientes esperaría en la utilización de terapias antisentido para tratar enfermedades genéticas?

31. Observaciones recientes indican que el corte y empalme alternativo es un mecanismo común de los eucariotas para expandir su repertorio de funciones génicas. Estudios realizados por Xu y sus colaboradores (2002. *Nuc. Acid. Res.* 30:3754-66) indican que aproximadamente el 50 por ciento de los genes humanos utilizan corte y empalme alternativo, y que aproximadamente el 15 por ciento de las mutaciones causantes de enfermedades implican un corte y empalme alternativo aberrante. Los distintos tejidos muestran frecuencias de corte y empalme alternativo extraordinariamente diferentes, siendo el cerebro quien justifica aproximadamente el 18 por ciento de estos sucesos. (a) ¿Qué significa corte y empalme alternativo, y qué es una isoforma? (b) ¿Qué estrategia evolutiva ofrece el corte y empalme alternativo, y por qué algunos tejidos realizan más procesos de corte y empalme alternativo que otros?

LECTURAS SELECCIONADAS

Barrell, B.G., Air, G., and Hutchinson, C. 1976. Overlapping genes in bacteriophage ϕX174. *Nature* 264:34–40.

Barrell, B.G., Banker, A.T., and Drouin, J. 1979. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282:189–94.

Bass, B.L., ed. 2000. *RNA Editing*. Oxford: Oxford University Press.

Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:575–80.

Brenner, S., Stretton, A.O.W., and Kaplan, D. 1965. Genetic code: The nonsense triplets for chain termination and their suppression. *Nature* 206:994–98.

Cattaneo, R. 1991. Different types of messenger RNA editing. *Annu. Rev. Genet.* 25:71–88.

Cech, T.R. 1986. RNA as an enzyme. *Sci. Am.* (Nov.) 255(5):64–75.

———. 1987. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* 236:1532–39.

Chambon, P. 1981. Split genes. *Sci. Am.* (May) 244:60–71.

Cramer, P., et al. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288:640–49.

Crick, F.H.C. 1962. The genetic code. *Sci. Am.* (Oct.) 207:66–77.

———. 1966a. The genetic code: III. *Sci. Am.* (Oct.) 215:55–63.

———. 1966b. Codon–anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19:548–55.

Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R.J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227–32.

Darnell, J.E. 1983. The processing of RNA. *Sci. Am.* (Oct.) 249:90–100.

———. 1985. RNA. *Sci. Am.* (Oct.) 253:68–87.

Dickerson, R.E. 1983. The DNA helix and how it is read. *Sci. Am.* (Dec.) 249:94–111.

Dugaiczk, A., et al. 1978. The natural ovalbumin gene contains seven intervening sequences. *Nature* 274:328–33.

Fiers, W., et al. 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260:500–507.

Gamow, G. 1954. Possible relation between DNA and protein structures. *Nature* 173:318.

Gnatt, A.L., et. al. 2001. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292:1876–82.

Hall, B.D., and Spiegelman, S. 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 47:137–46.

Hamkalo, B. 1985. Visualizing transcription in chromosomes. *Trends Genet.* 1:255–60.

Jukes, T.H. 1963. The genetic code. *Am. Sci.* 51:227–45.

Khorana, H.G. 1967. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Harvey Lectures* 62:79–105.

Miller, O.L., Hamkalo, B., and Thomas, C. 1970. Visualization of bacterial genes in action. *Science* 169:392–95.

Nirenberg, M.W. 1963. The genetic code: II. *Sci. Am.* (March) 190:80–94.

O'Malley, B., et al. 1979. A comparison of the sequence organization of the chicken ovalbumin and ovomucoid genes. In *Eucaryotic gene regulation*, ed. R. Axel, et al., pp. 281–99. Orlando, FL: Academic Press.

Reed, R., and Maniatis, T. 1985. Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell* 41:95–105.

Ross, J. 1989. The turnover of mRNA. *Sci. Am.* (April) 260:48–55.

Sharp, P.A. 1994. Nobel Lecture: Split genes and RNA splicing. *Cell* 77:805–15.

Steitz, J.A. 1988. Snurps. *Sci. Am.* (June) 258(6):56–63.

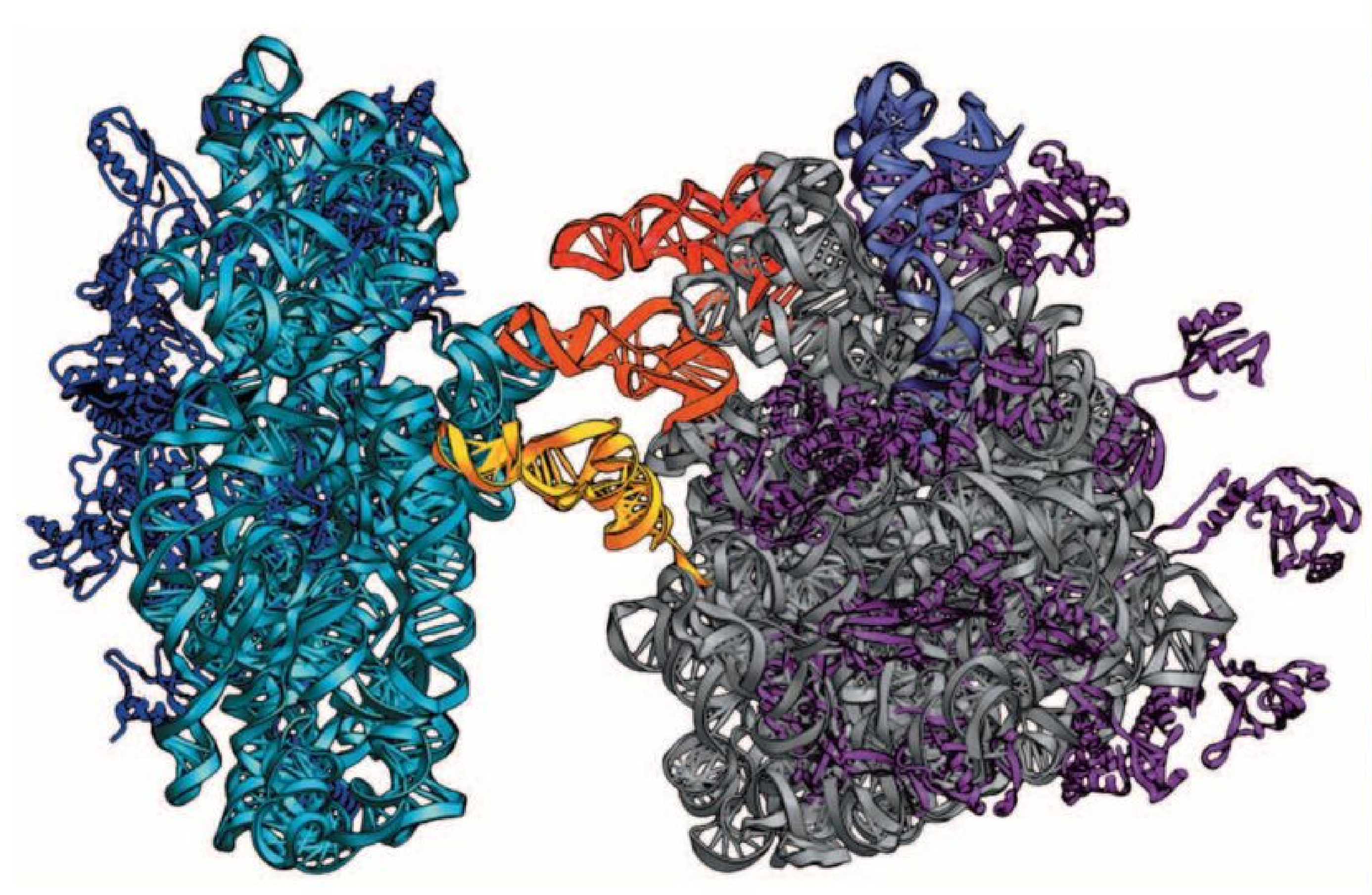
Volkin, E., and Astrachan, L. 1956. Phosphorus incorporation in *E. coli* ribonucleic acids after infection with bacteriophage T2. *Virology* 2:149–61.

Wang, Q., et. al. 2000. Requirement of the RNA editing deaminase *ADAR1* gene for embryonic erythropoiesis. *Science* 290:1765–68.

Watson, J.D. 1963. Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* 140:17–26.

Woychik, N.A. and Jampsey, M. 2002. The RNA polymerase II machinery: Structure illuminates function. *Cell* 108:453–64.

Traducción y proteínas



Estructura cristalina del ribosoma 70S de Thermus thermofilus, *con tres RNA transferentes unidos.* Reproducido de la cubierta de *Science*, vol. 292, del 4 de mayo de 2001, Crystal structure of a *Thermus thermofilus* 70*S* ribosome containing three bound transfer RNAs (top) and exploded views showing its different molecular components (middle and bottom). Imagen proporcionada por el Dr. Albion Baucom (baucom@biology.ucsc.edu). Copyright de la American Association for the Advancement of Science.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La secuencia de ribonucleótidos del RNA mensajero (mRNA) refleja la información genética almacenada en el DNA que forma los genes, y se corresponde con la secuencia aminoacídica de las proteínas que estos codifican.
- El proceso de traducción descodifica la información del mRNA, lo que conduce a la síntesis de cadenas polipeptídicas.
- La traducción implica la interacción del mRNA, el tRNA, los ribosomas y diversos factores de traducción que son esenciales para la iniciación, la elongación y la terminación de la cadena polipeptídica.
- Las proteínas, el producto final de muchos genes, adquieren una conformación tridimensional cuya base es la secuencia primaria de los aminoácidos de las cadenas polipeptídicas que forman cada proteína.
- La función de todas las proteínas está estrechamente relacionada a su estructura tridimensional, que puede alterarse por mutación.

En el Capítulo 13 se estableció que existe un código genético que almacena la información en forma de codones tripletes en el DNA, y que mediante un proceso de transcripción esta información se expresa inicialmente en un RNA mensajero complementario a la cadena molde de la hélice de DNA. Sin embargo, en la mayor parte de casos el producto final de la expresión génica es una cadena polipeptídica formada por una serie lineal de aminoácidos cuya secuencia ha sido dictada por el código genético. En este capítulo examinaremos cómo la información presente en el mRNA se traduce para generar polipéptidos, que luego se pliegan en moléculas proteicas. También repasaremos las pruebas que confirman que las proteínas son el producto final de los genes, y discutiremos brevemente los diversos niveles de la estructura de las proteínas, la diversidad de éstas y su función. Esta información incrementa nuestro conocimiento de la expresión génica, y proporciona una base importante para interpretar cómo las mutaciones que se producen en el DNA pueden tener por resultado los diversos efectos fenotípicos que se observan en los organismos.

14.1 La traducción del mRNA depende de los ribosomas y de los RNA transferentes

La traducción del mRNA es la polimerización biológica de aminoácidos en cadenas polipeptídicas. Este proceso, al que se hizo referencia al tratar el código genético, se produce sólo en asociación con los ribosomas, que sirven de mesa de trabajo no específica. La pregunta central de la traducción es cómo los codones tripletes del mRNA dirigen a los aminoácidos específicos hacia sus posiciones correctas en el polipéptido. Al descubrirse los **RNA transferentes** (**tRNA**) se contestó a esta pregunta. Este tipo de moléculas adapta el aminoácido correcto a los codones tripletes específicos del mRNA. En 1957, Francis Crick postuló esta función adaptadora del tRNA.

En asociación con un ribosoma, el mRNA presenta un codón que reclama a su aminoácido específico. Debido a que una molécula de tRNA específica contiene en su secuencia tres ribonucleótidos consecutivos complementarios al **codón**, éstos se denominan **anticodones** y pueden emparejarse con el codón. Otra región de este tRNA está unida covalentemente al aminoácido correspondiente.

Dentro del ribosoma, los puentes de hidrógeno entre los tRNA y el mRNA mantienen cercanos a los aminoácidos, de manera que se puede formar un enlace peptídico. Este proceso se produce de manera continua al desplazarse el mRNA por el ribosoma, y los aminoácidos polimerizan en una cadena polipeptídica. Antes de discutir el proceso real de la traducción, consideraremos primero las estructuras del ribosoma y del RNA transferente.

Estructura del ribosoma

Debido a su función esencial en la expresión de la información genética, el **ribosoma** ha sido ampliamente analizado. Una célula bacteriana contiene unas 10.000 de estas estructuras, y una célula eucariótica contiene muchas más. El microscopio electrónico ha revelado que el diámetro mayor del ribosoma bacteriano mide unos 250 nm, y que está formado por dos subunidades, una grande y otra pequeña. Ambas subunidades contienen una o más moléculas de rRNA y una colección de **proteínas ribosómicas**. A veces, cuando se asocian las dos subunidades en un único ribosoma, la estructura se denomina **monosoma**.

Las diferencias específicas entre los ribosomas procarióticos y los eucarióticos se resumen en la Figura 14.1. Los componentes de las subunidades y del rRNA se aíslan y caracterizan por su comportamiento de sedimentación (su velocidad de migración, que se abrevia *S*, como se introdujo en el Capítulo 10) en gradientes de sacarosa. En procariotas, el monosoma es una partícula de 70*S*, y en eucariotas es de 80*S* aproximadamente. Los coeficientes de sedimentación, que reflejan la variación en la tasa de migración de partículas y moléculas de diferente tamaño, no son aditivos. Por ejemplo, el monosoma 70*S* está formado por una subunidad 50*S* y otra 30*S*, y el monosoma 80*S* lo está por una 60*S* y otra 40*S*.

En procariotas, la subunidad grande está formada por una molécula de rRNA 23*S*, por una molécula de rRNA 5*S* y por 31 proteínas ribosómicas. En el equivalente eucariótico, una molécula de rRNA 28*S* está acompañada por una molécula de rRNA 5,8*S*, por una 5*S* y por unas 49 proteínas. La subunidad procariótica pequeña está formada por un componente de rRNA 16*S* y por 21 proteínas. En el equivalente eucariótico, se encuentra un componente de rRNA 18*S* y unas 33 proteínas. En el Figura 14.1 se muestra el peso molecular aproximado y el número de nucleótidos de estos componentes.

Respecto a los componentes de los ribosomas, actualmente se sabe que las moléculas de RNA proporcionan la base para todas las funciones catalíticas importantes asociadas a la traducción. Se cree que las numerosas proteínas, cuya función fue un misterio durante mucho tiempo, promueven la unión de las diversas moléculas implicadas en la traducción y, en general, a ajustar con precisión todo el proceso. Esta conclusión se basa en la observación experimental de que algunas de las funciones catalíticas de los ribosomas también se producen en ribosomas carentes de proteínas.

Experimentos de hibridación molecular han establecido el grado de redundancia de los genes que codifican los componentes de rRNA. El genoma de *E. coli* contiene siete copias de una secuencia que codifica los tres componentes —23*S*, 16*S* y 5*S*. El transcrito inicial de estos genes produce una molécula de RNA 30*S* que se corta enzimáticamente en los componentes pequeños. El hecho de tener junta la información genética que codifica estos tres componentes de rRNA asegura que, tras múltiples sucesos de transcripción, al montar

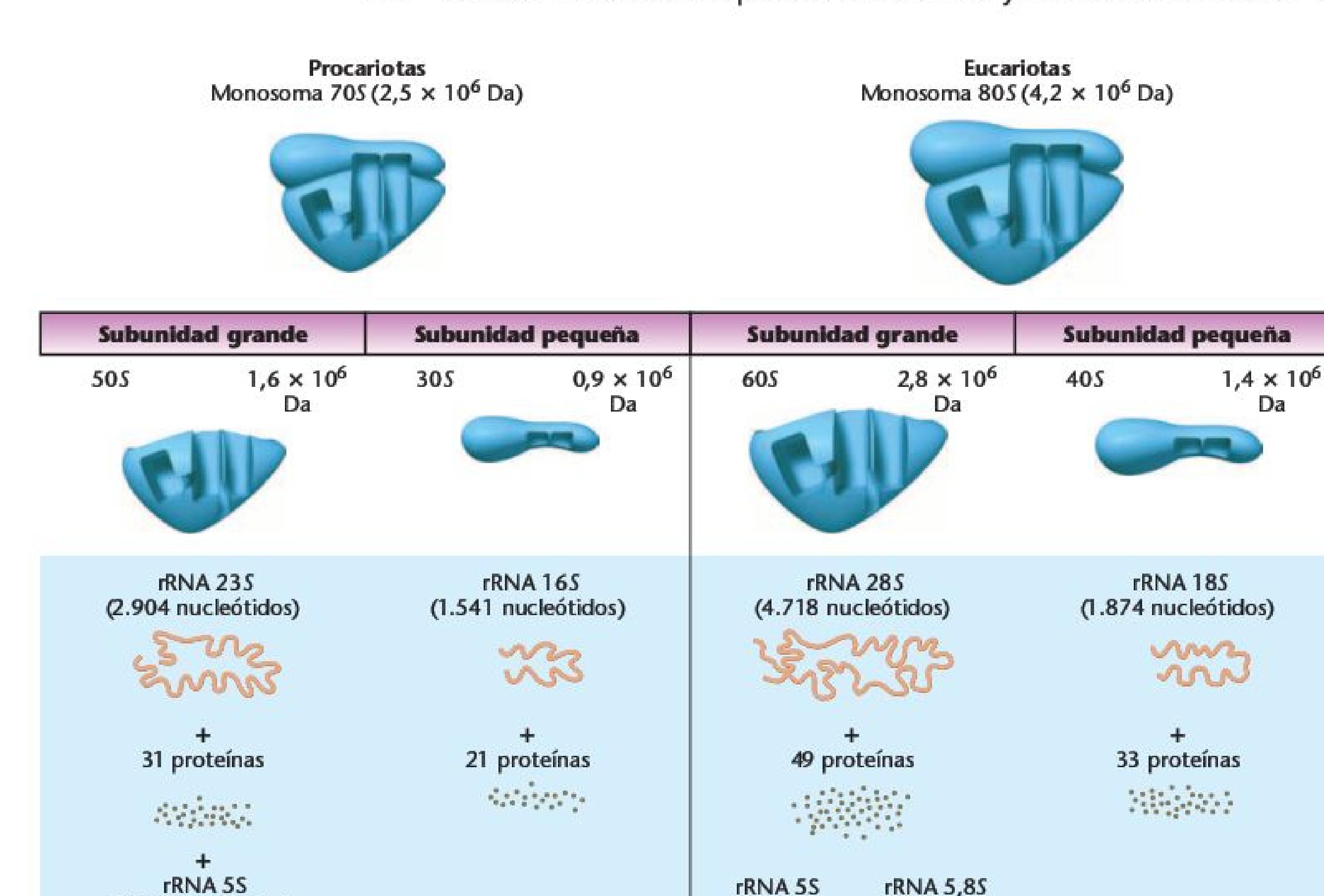


FIGURA 14.1 Comparación de los componentes de los ribosomas procarióticos y eucarióticos.

los ribosomas habrá cantidades iguales de los tres componentes.

En eucariotas hay muchas más copias de la secuencia que codifica los componentes 28*S*, 18*S* y 5.8*S* En *Drosophila*, hay aproximadamente 120 copias por genoma haploide que se transcriben cada una en una molécula de unos 34*S* . Ésta se procesa en los tipos 28*S*, 18*S* y 5,8*S*. En *X. laevis* hay más de 500 copias por genoma haploide. En las células de mamífero el transcrito inicial es de 45*S*. Los genes del rRNA, denominados **rDNA**, forman parte de la fracción de DNA moderadamente repetido y se presentan agrupados en varias localizaciones cromosómicas.

En eucariotas, cada agrupación está formada por **repeticiones en tándem**, y cada unidad está separada por una secuencia no codificante de **DNA espaciador**. [Véase la micrografía de la Figura 13.15(b)]. En la especie humana, estas agrupaciones génicas se han localizado en el extremo de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. El componente de rRNA 5*S* de eucariotas no forma parte de este transcrito más largo. En vez de ello, los genes que codifican este componente ribosómico son diferentes y están localizados aparte. En el cromosoma 1 humano se ha localizado una agrupación de genes que los codifican.

A pesar del detallado conocimiento disponible sobre la estructura y origen genético de los componentes ribosómicos, una completa comprensión de la función de estos componentes ha escapado a los genéticos. No es sorprendente, puesto que el ribosoma es, quizás, la más intrincada de las estructuras celulares. En bacterias, el monosoma tiene un peso molecular combinado de 2,5 millones de daltons!

La estructura del tRNA

Debido a su pequeño tamaño y a su estabilidad dentro de la célula, se ha investigado extensamente a los RNA transferentes (tRNA) y son las moléculas de RNA mejor caracterizadas. Están formados por solo 75-90 nucleótidos, y exhiben una estructura casi idéntica en procariotas y en eucariotas. En ambos tipos de organismos, los tRNA se transcriben en largos precursores, que se cortan en moléculas de tRNA maduras de 4*S*. En *E. coli*, por ejemplo, $tRNA^{tyr}$ (el superíndice identifica al

Seminario Web 14.1
RNA transferentes

aminoácido específico que se le une)[1] está formado por 77 nucleótidos, aunque su precursor contiene 126.

En 1965, Robert Holley y sus colaboradores dieron a conocer la secuencia completa del $tRNA^{ala}$ aislado en levadura. Fue de gran interés encontrar que varios nucleótidos son específicos del tRNA. Como se muestra en la Figura 14.2, cada uno es una modificación de una de las cuatro bases nitrogenadas esperadas en el RNA (G, C, A y U). Por ejemplo, se encuentra ácido inosínico, que contiene la purina hipoxantina. Otros ejemplos son el ácido ribotimidílico y la pseudouridina. Estas estructuras modificadas, a veces denominadas bases *extrañas*, *raras*, o *no usuales*, se generan después de la transcripción, ilustrando el concepto más general de **modificación postranscripcional**. En este caso, durante la transcripción se inserta la base no modificada y, posteriormente, reacciones enzimáticas catalizan las modificaciones químicas de la base.

El análisis de Holley le condujo a proponer el modelo bidimensional de **hoja de trébol del tRNA**. Se ha sabido que el tRNA muestra una estructura secundaria debido al emparejamiento de bases. Holley descubrió que podía ordenar el modelo lineal de manera que se formarían varios trechos de emparejamiento de bases. Esta ordenación formaba una serie de pedúnculos emparejados y lazos sin emparejar, parecido a la forma de una hoja de trébol. Congruente con ello, los lazos contenían las bases modificadas que normalmente no forman emparejamientos de bases. El modelo de Holley se muestra en la Figura 14.3.

Debido a que los tripletes GCU, GCC y GCA especifican alanina, Holley buscó en su molécula de $tRNA^{ala}$ una secuencia anticodón complementaria a uno de estos codones. La encontró en forma de CGI (en dirección 3′ a 5′), en uno de los lazos de la hoja de trébol. La base nitrogenada I (ácido inosínico) puede formar puentes de hidrógeno con U, C y A, en la tercera posición de los tripletes. De este modo se estableció el **lazo anticodón**.

Tras examinar otras clases de tRNA, se observaron numerosas características constantes. Primero, en el extremo 3′, todos los tRNA tienen la secuencia *...pCCA*-3′, que se añade postranscripcionalmente. El aminoácido se une covalentemente a esta adenosina terminal del extremo de la molécula. Al otro extremo de la molécula 5′, todos los tRNA tienen 5′-*G*.

Además, las longitudes de los diversos pedúnculos y lazos son similares. Cada tRNA examinado contiene también un anticodón complementario al codón conocido del aminoácido que especifica, y todos los lazos anticodón están en la misma posición en la hoja de trébol.

Puesto que el modelo de la hoja del trébol se predijo exclusivamente sobre la base de la secuencia nucleotídica, había

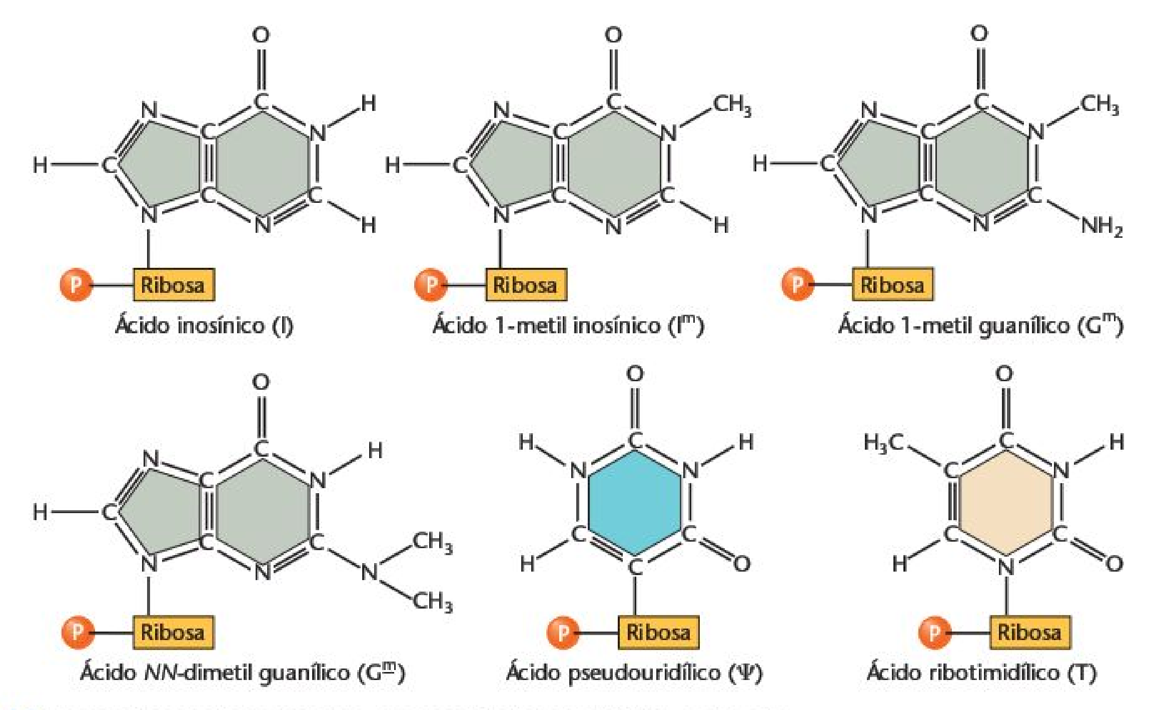


FIGURA 14.2 Bases nitrogenadas poco comunes encontradas en el RNA transferente.

[1] *Nota del traductor:* de hecho, el superíndice indica la *especificidad* del tRNA por su aminoácido, no necesariamente el aminoácido que lleva cargado. En situaciones normales, éste coincide, pero bajo condiciones experimentales, es posible modificar el aminoácido cargado convirtiéndolo en otro. Por ejemplo, en el Problema 14.28 se comenta el experimento de F. Chapeville en el que se trató $tRNA^{cys}$ (cargado con cisteína) con hidruro de níquel, que elimina el grupo sulfuro de este aminoácido convirtiéndolo en alanina. Esta alanina está unida ahora al $tRNA^{cys}$ (que especifica para cisteína), que entonces se denomina alanil-$tRNA^{cys}$ (ya que es específico para cisteína pero lleva una alanina cargada).

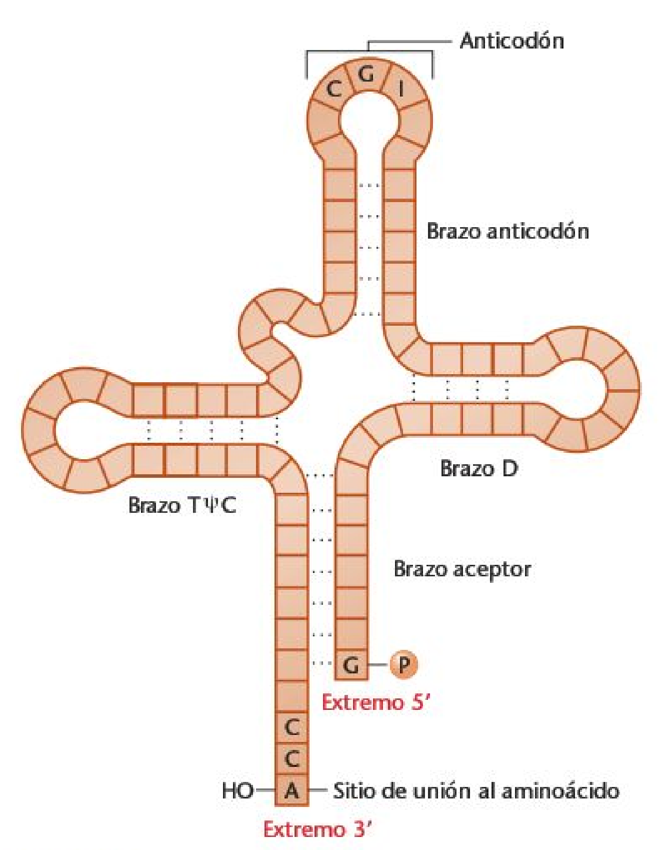


FIGURA 14.3 Modelo bidimensional de la hoja de trébol de Holley del RNA transferente.

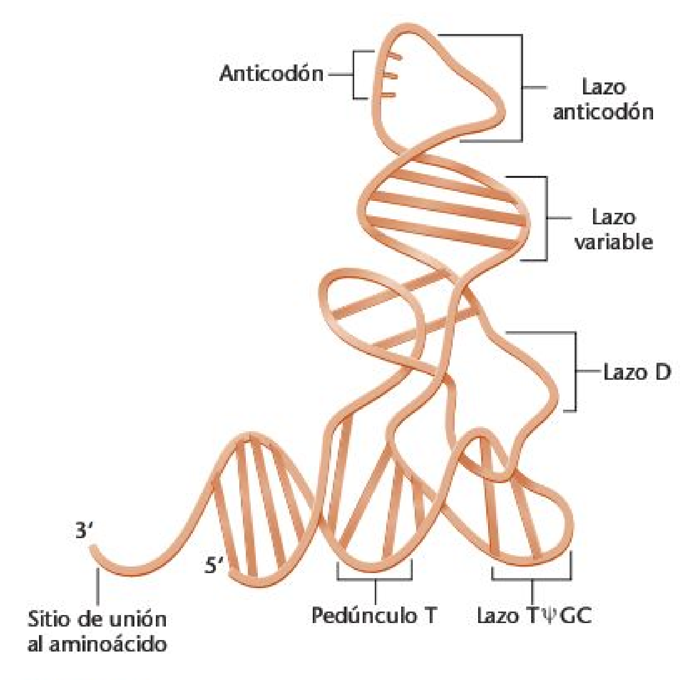


FIGURA 14.4 Modelo tridimensional del RNA transferente.

un gran interés en el examen cristalográfico con rayos X del tRNA, que revela la estructura tridimensional. En 1974, Alexander Rich y sus colaboradores en los Estados Unidos, y J. Roberts, B. Clark, Aaron Klug y sus colaboradores en Inglaterra, habían podido cristalizar y realizar cristalografía de rayos X de tRNA a una resolución de 3Å. A esta resolución, se discierne el patrón formado por nucleótidos individuales.

Como consecuencia de estas investigaciones, actualmente se dispone de un modelo tridimensional completo del tRNA (Figura 14.4). Se ha localizado el lazo anticodón y la región aceptora 3′ (donde el aminoácido se une covalentemente). Se ha especulado que las formas de los lazos intermedios y de los pedúnculos pueden proporcionar la conformación tridimensional que es reconocida por las enzimas específicas responsables de añadir el aminoácido al tRNA, tema que vamos a tratar a continuación.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué información experimental condujo al modelo de hoja de trébol del tRNA, como lo propuso Holley? ¿Qué aproximación se utilizó para localizar el anticodón en el tRNA?

Carga del tRNA

Antes de que se pueda realizar la traducción, las moléculas de tRNA deben unirse químicamente a sus respectivos aminoácidos. Este proceso de activación, denominado **carga** o aminoacilación, está dirigido por las enzimas denominadas **aminoacil tRNA sintetasas**. Como hay 20 aminoácidos diferentes, tiene que haber al menos 20 moléculas diferentes de tRNA y un número igual de enzimas. En teoría, como hay 61 tripletes codificantes, podría haber el mismo número de tRNA y enzimas. Sin embargo, debido a la capacidad de tambaleo del tercer miembro de un triplete codificante, actualmente se cree que hay al menos 32 tRNA diferentes; también se cree que hay solo 20 sintetasas, una para cada aminoácido, a pesar del mayor número de los correspondientes tRNA.

En la Figura 14.5 se esquematiza el proceso de carga. En el paso inicial, el aminoácido se convierte en su forma activada, reaccionando con ATP para formar un **ácido aminoacil-adenílico**. Se forma un enlace covalente entre el grupo fosfato 5′ del ATP y el extremo carboxilo del aminoácido. Esta molécula permanece asociada con la enzima sintetasa, formando un complejo que reacciona con la molécula específica de tRNA. En el siguiente paso, el aminoácido se transfiere al tRNA adecuado y se une covalentemente al residuo adenina del extremo 3′. El tRNA cargado puede participar directamente en la síntesis proteica. Las aminoacil tRNA sintetasas son enzimas altamente específicas puesto que reconocen un sólo aminoácido y al subconjunto de tRNA correspondientes a ese aminoácido, denominados **tRNA isoaceptores**. Este es un punto crucial si debe mantenerse la fidelidad de la traducción.

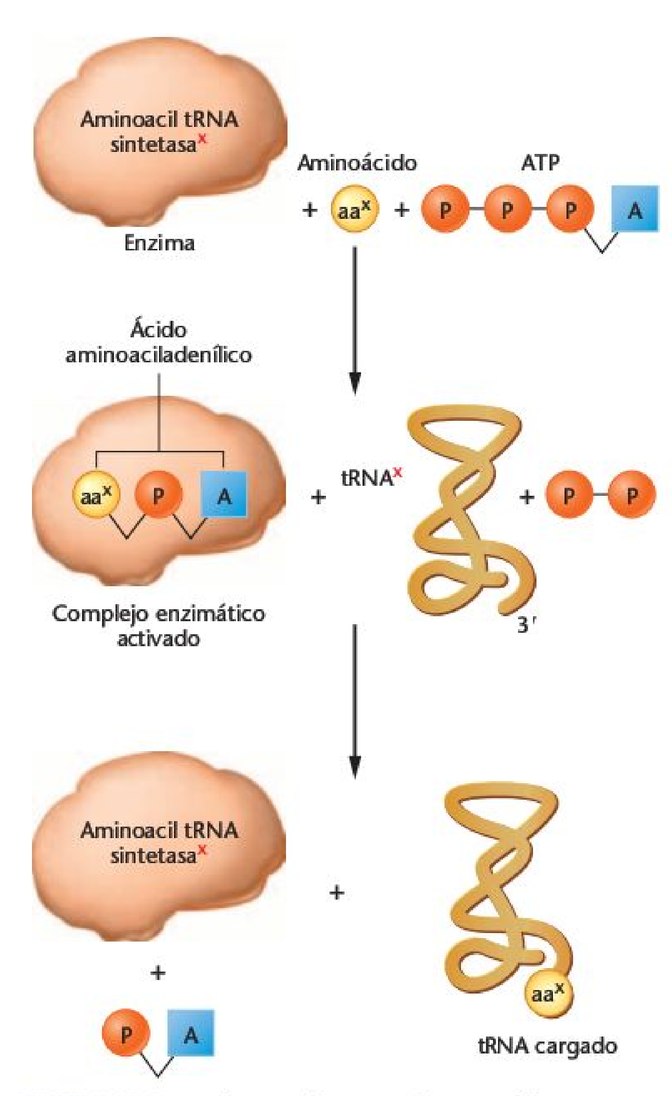


FIGURA 14.5 Estadios en el proceso de carga del tRNA. La «x» significa que, para cada aminoácido, sólo el tRNA específico y la aminoacil tRNA sintetasa específica participan en el proceso de carga.

Ahora resuelva esto

El Problema 14.28 de la página 411 le pregunta sobre si el responsable de la respuesta del tRNA cargado al mRNA durante la traducción es el propio tRNA o el aminoácido añadido al tRNA durante la carga.

Sugerencia: En este experimento, cuando el codón triplete del mRNA pide una cisteína, se inserta alanina durante la traducción, a pesar de ser un aminoácido «incorrecto».

14.2 La traducción del mRNA puede dividirse en tres pasos

Del mismo modo que la transcripción, el proceso de traducción puede describirse mejor si se divide en fases discretas. Consideraremos tres fases, cada una con su propio conjunto de esquemas (Figuras 14.6, 14.7 y 14.8). Hay que ser consciente, sin embargo, de que la traducción es un proceso dinámico y continuo. Muchos de los factores proteicos y de sus funciones están resumidos en la Tabla 14.1.

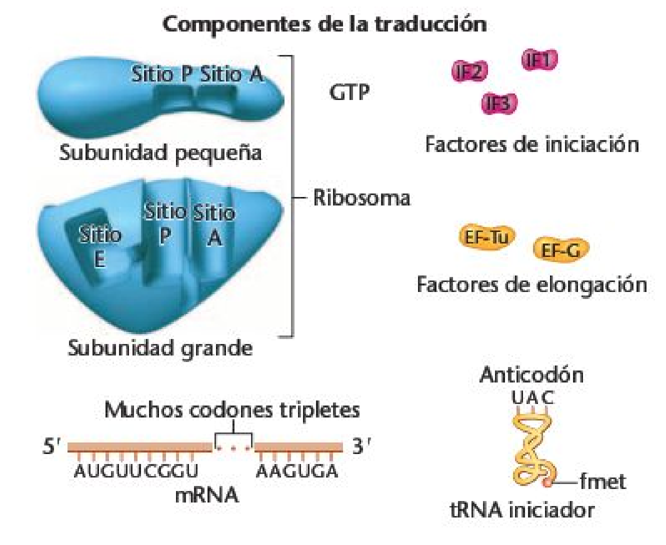
Iniciación

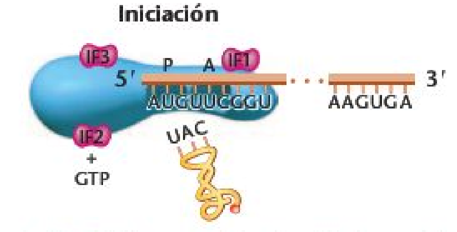
La iniciación de la traducción en procariotas se muestra en la Figura 14.6. Recuerde que los ribosomas sirven de mesa de trabajo inespecífica para el proceso de traducción. La mayoría de ribosomas, cuando no están participando en la traducción, se disocian en sus subunidades grande y pequeña. En la iniciación de la traducción en *E. coli* participan la subunidad ribosómica pequeña, una molécula de mRNA, un tRNA iniciador específico cargado, GTP, Mg^{++} y diversos factores de iniciación (IF) de carácter proteico. Inicialmente éstos forman parte de la subunidad pequeña del ribosoma, y son necesarios para incrementar la afinidad de unión de los diversos compo-

TABLA 14.1 DIVERSOS FACTORES PROTEICOS IMPLICADOS EN LA TRADUCCIÓN EN *E. COLI*

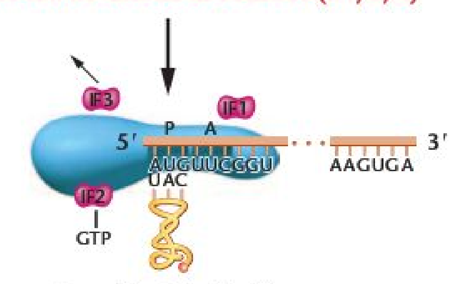
Proceso	Factor	Función
Iniciación de la traducción	IF1	Estabiliza la subunidad 30*S*
	IF2	Une el tRNA-fmet al complejo 30*S*-mRNA; se une a GTP y estimula la hidrólisis
	IF3	Une la subunidad 30*S*30*S* al mRNA; disocia a los monosomas en subunidades después de la terminación
Elongación del polipéptido	EF-Tu	Se une a GTP; lleva al aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma
	EF-Ts	Genera EF-Tu activo
	EF-G	Estimula la translocación; es dependiente de GTP
Terminación de la traducción y liberación del polipéptido	RF1	Cataliza la liberación de la cadena polipeptídica del tRNA y disocia el complejo de translocación; es específico de los codones de terminación UAA y UAG
	RF2	Se comporta como RF1; es específico de los codones UGA y UAA
	RF3	Estimula a RF1 y a RF2

Seminario Web 14.2
Traducción proteica

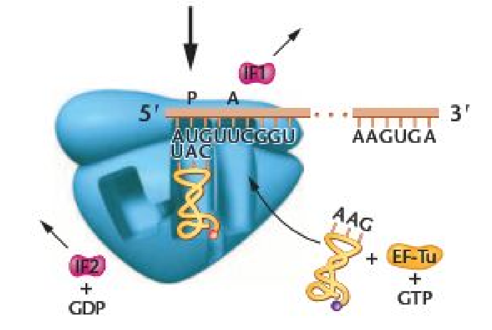




Paso 1. El mRNA se une a la subunidad pequeña junto con los factores de iniciación (IF1, 2, 3)



Paso 2. El tRNA^{fmet} iniciador se une al codón del mRNA en el sitio P; se libera IF3



Paso 3. La subunidad grande se une al complejo: se liberan IF1 e IF2; EF-Tu se une al tRNA, facilitando su entrada en el sitio A

FIGURA 14.6 Iniciación de la traducción. Los componentes se muestran a la izquierda.

nentes traduccionales. A diferencia de las proteínas ribosómicas, los IF se liberan del ribosoma una vez se ha completado la iniciación. En procariotas, el codón de iniciación del mRNA —AUG— especifica el aminoácido modificado **formilmetionina**.

La subunidad ribosómica pequeña se une a varios factores de iniciación, y este complejo se une, a su vez, al mRNA (Paso 1). En bacterias, en esta unión participa una secuencia de hasta seis ribonucleótidos (AGGAGG, no se muestra en la Figura 14.6), que *precede* al codón AUG inicial del mRNA. Esta secuencia (que contiene sólo purinas y se denomina **secuencia de Shine-Dalgarno**) se empareja con una región del RNA 16*S* de la subunidad ribosómica pequeña, facilitando la iniciación.

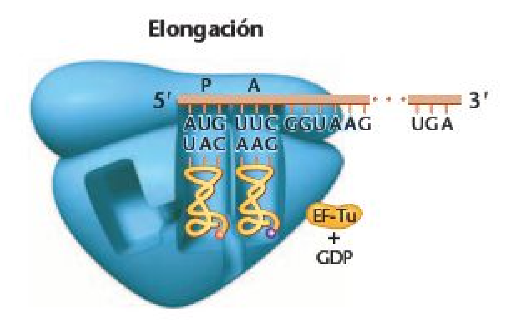
Entonces, otra proteína de iniciación facilita la unión del tRNA-formilmetionina cargado a la subunidad pequeña en respuesta al triplete AUG (Paso 2). Este paso «ajusta» la fase de lectura para que se lean adecuadamente todos los grupos posteriores de tres ribonucleótidos. Este agregado es el **complejo de iniciación**, al que se une la subunidad ribosómica grande. En este proceso se hidroliza una molécula de GTP, que suministra la energía necesaria, y se liberan los factores de iniciación (Paso 3).

Elongación

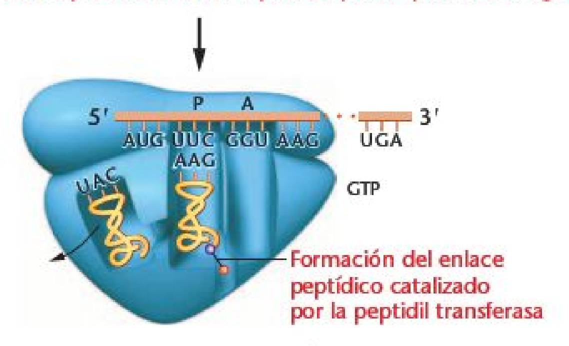
En la Figura 14.7 se muestra la segunda fase de la traducción, la elongación. Una vez están ensambladas las dos subunidades del ribosoma con el mRNA, se forman dos sitios de unión para las moléculas de tRNA cargadas. Se designan como **sitio P**, o **peptidil**, y **sitio A**, o **aminoacil**. El tRNA de iniciación cargado se une al sitio P, siempre y cuando el triplete AUG del mRNA esté en la posición que le corresponde en la subunidad pequeña.

El alargamiento de la cadena peptídica en crecimiento se denomina **elongación**. La secuencia del segundo triplete del mRNA dice qué molécula de tRNA cargada se colocará en el sitio A (Paso 1). Cuando está presente, la **peptidil transferasa** cataliza la formación del enlace peptídico, que une a los dos aminoácidos (Paso 2). La actividad catalítica peptidil transferasa reside en el rRNA 23*S* de la subunidad grande, no en una de las proteínas ribosómicas. Al mismo tiempo, se hidroliza (se rompe) el enlace covalente que hay entre el aminoácido y el tRNA que ocupa el sitio P. El producto de esta reacción es un dipéptido, que está unido al extremo 3′ del tRNA que todavía se halla en el sitio A.

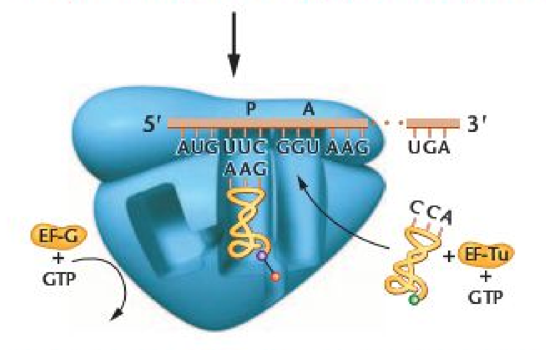
Antes de que se pueda repetir la elongación, el tRNA unido al sitio P, que ahora no está cargado, debe liberarse de la subunidad grande. El tRNA sin carga se traslada temporalmente a un tercer sitio del ribosoma denominado **sitio E** (se denomina E por la palabra inglesa *exit*, que significa salida o *escape*). Entonces, el complejo **mRNA-tRNA-aa$_2$-aa$_1$** íntegro se desplaza (se transloca) una distancia de tres nucleótidos en dirección al sitio P (Paso 3). Este suceso necesita varios factores de elongación (EF) proteicos y energía proveniente de la hidrólisis de



Paso 1. El segundo tRNA cargado ha entrado en el sitio A, con la ayuda de EF-Tu; empieza el primer paso de elongación.



Paso 2. Se forma el enlace peptídico; el tRNA sin carga se mueve al sitio E y después sale del ribosoma; el mRNA se ha translocado tres bases hacia la izquierda, y el resultado es que el tRNA que lleva el dipéptido se desplaza al sitio P.



Paso 3. Se completa el primer paso de elongación, ayudado por EF-G. El tercer tRNA cargado está listo para entrar en el sitio A.

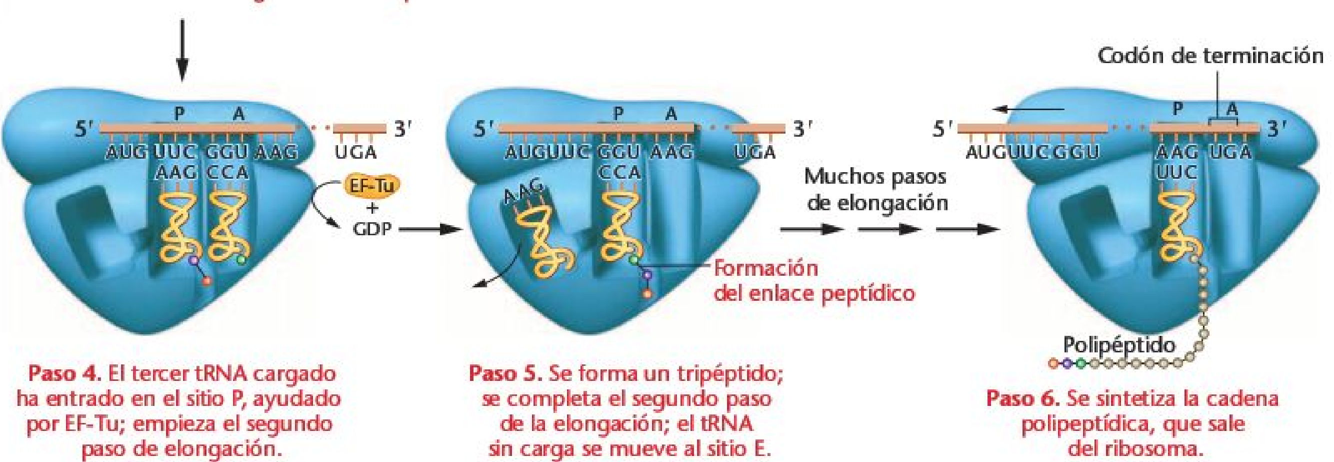
GTP. El resultado es que el tercer codón del mRNA está ahora en posición de aceptar otro tRNA cargado específico en el sitio A (Paso 4). Una manera simple de distinguir entre los dos sitios es recordar que, *después del desplazamiento*, el sitio P contiene tRNA unido a una cadena peptídica (*P* de peptídica), mientras que el sitio A contiene un tRNA unido a un aminoácido (*A* de aminoácido).

Esta secuencia de elongación se va repitiendo una vez tras de otra (Pasos 5 y 6). Cada vez que el mRNA avanza por el ribosoma se añade un aminoácido más a la cadena polipeptídica en crecimiento. Cuando se ha ensamblado una cadena polipeptídica de tamaño razonable (unos 30 aminoácidos), ésta empieza a asomar por la base de la subunidad grande, como se muestra en el Paso 6. El polipéptido en elongación emerge por un túnel que se encuentra dentro de la subunidad grande.

Como hemos visto, la función de la subunidad pequeña durante la elongación es la de «descodificar» los codones del mRNA, mientras que la función de la subunidad grande es la síntesis del enlace peptídico. La eficiencia del proceso es extraordinariamente alta; la tasa de error observada es de sólo 10^{-4}. Habrá un aminoácido incorrecto sólo en uno de cada 20 polipéptidos que tengan un tamaño promedio de 500 aminoácidos! En *E. coli*, la elongación se produce a una velocidad de 15 aminoácidos por segundo a 37 °C.

Terminación

En la Figura 14.8 se muestra la terminación, la tercera fase de la traducción. La terminación de la síntesis proteica está señalada por uno o más de los tres codones tripletes de terminación en el sitio A: UAG, UAA o UGA. Estos codones no especifican ningún aminoácido, por lo que no atraen al sitio A a ningún tRNA. Se denominan **codones de *stop* (codones de parada)**, **codones de terminación** o **codones sin sentido**. El polipéptido terminado está aún unido al tRNA terminal en el sitio P, y el sitio A está vacío. El codón de terminación señala la acción de **factores de liberación** (o **de terminación**) **dependientes de GTP**, que cortan la cadena polipeptídica del



Paso 4. El tercer tRNA cargado ha entrado en el sitio P, ayudado por EF-Tu; empieza el segundo paso de elongación.

Paso 5. Se forma un tripéptido; se completa el segundo paso de la elongación; el tRNA sin carga se mueve al sitio E.

Paso 6. Se sintetiza la cadena polipeptídica, que sale del ribosoma.

FIGURA 14.7 Elongación de la cadena del polipéptido en crecimiento durante la traducción.

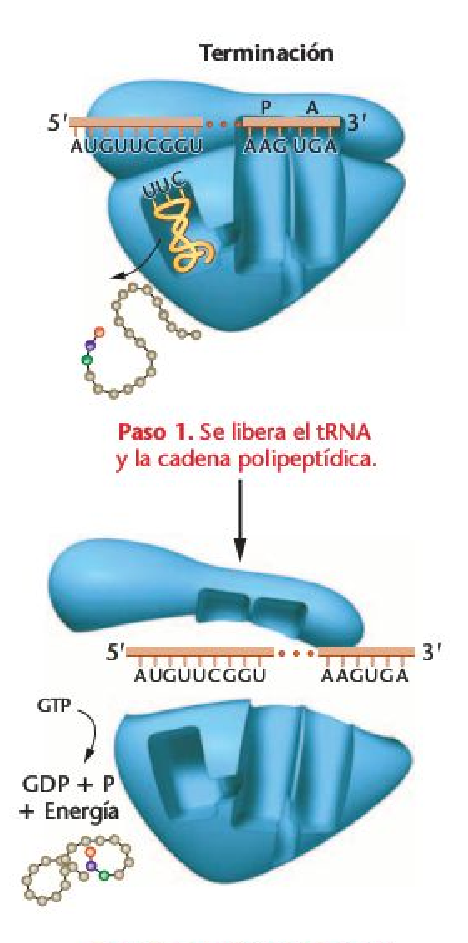


FIGURA 14.8 Terminación del proceso de traducción.

tRNA terminal, liberándola del complejo de traducción (paso 1). Cuando se produce la separación, se libera el tRNA del ribosoma, y éste se disocia en sus subunidades (paso 2). Si apareciese un codón de terminación en medio de una molécula de mRNA como consecuencia de una mutación, se produciría el mismo proceso, y la cadena polipeptídica se terminaría prematuramente.

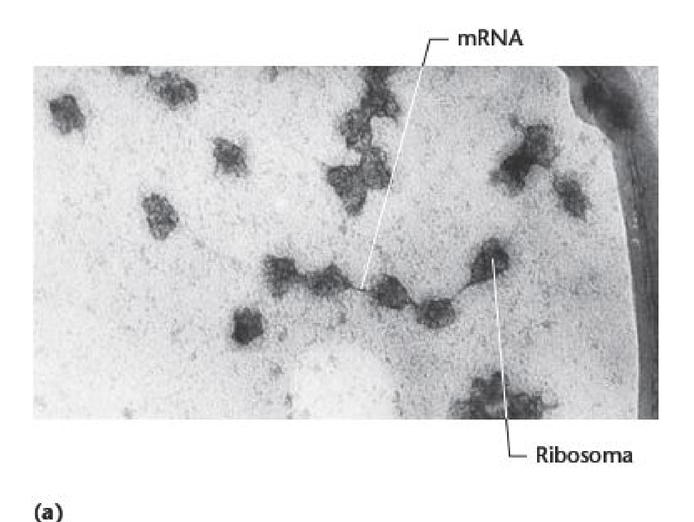
¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué información experimental verifica que determinados codones del mRNA especifican la terminación de la cadena polipeptídica durante la traducción?

Polirribosomas

Al continuar la elongación y cuando la porción inicial del mRNA ya ha pasado por el ribosoma, el mensajero queda libre para asociarse con otra subunidad pequeña y formar así otro complejo de iniciación. Este proceso se puede repetir varias veces en un mismo mRNA, dando por resultado lo que se denomina **polirribosoma** o simplemente **polisoma**.

Se pueden aislar y analizar los polirribosomas tras una lisis suave de las células. Las Figuras 14.9(a) y (b) muestran como se ven estos complejos al microscopio electrónico. En la Figura 14.9(a) se observa el mRNA (la línea fina) entre ribosomas individuales. La micrografía de la Figura 14.9(b) es aún más extraordinaria, ya que muestra las cadenas polipeptídicas emergiendo de los ribosomas durante la traducción. La formación de complejos de polisomas representa una utilización eficiente de los componentes disponibles para la síntesis proteica en un momento dado. Haciendo una analogía con las cintas de



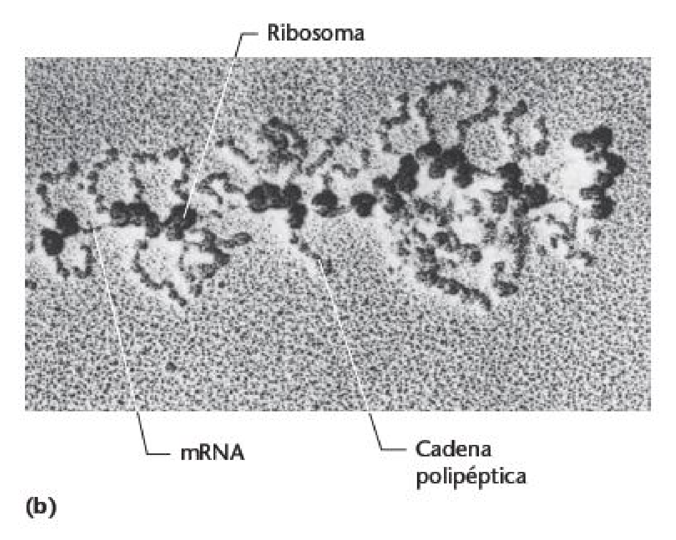


FIGURA 14.9 Polirribosomas vistos con el microscopio electrónico. Los de (a) provienen de reticulocitos de conejo y están ocupados en la traducción del mRNA de la hemoglobina, y los de (b) provienen de células de glándulas salivares de la mosca de agua *Chironomus thummi*. En (b) se puede ver como emerge la cadena polipeptídica naciente de cada ribosoma. Su longitud incrementa al avanzar la traducción, desde la izquierda (5′) a la derecha (3′) del mRNA.

música, una cinta (el mRNA) será interpretada simultáneamente por varios reproductores (los ribosomas). Pero en un momento dado, la música (el polipéptido que se sintetiza en cada ribosoma) estaría en diferentes estadios de ejecución.

14.3 El análisis cristalográfico ha revelado muchos detalles de los ribosomas procarióticos funcionales

El conocimiento del proceso de traducción y de la estructura de los ribosomas descrito en la sección anterior se basa principalmente en observaciones bioquímicas y genéticas, además de la visualización de los ribosomas al microscopio electrónico. Debido al enorme tamaño y complejidad de los ribosomas funcionales activos durante la traducción, la obtención de los cristales necesarios para los estudios de difracción de rayos X ha sido extremadamente difícil. No obstante, en los últimos años se han realizado grandes avances. Primero, se cristalizaron y analizaron las subunidades individuales de los ribosomas en diversos laboratorios, entre los que cabe destacar el de V. Ramakrishnan. Después, en 2001, Harry Noller y sus colaboradores examinaron la estructura cristalina del ribosoma 70*S* intacto y completo, con el mRNA y los tRNA asociados. Tanto Ramakrishna como Noller obtuvieron los ribosomas de la bacteria *Thermus thermophillus*.

Estas investigaciones han proporcionado muchas observaciones dignas de mención. La fotografía inicial de este capítulo muestra una imagen de uno de estos modelos, basado en los hallazgos de Noller. Por ejemplo, el tamaño y la forma de las subunidades, medidas en dimensiones atómicas, coinciden con las estimaciones iniciales basadas en microscopia electrónica de alta resolución. Además, la forma de los ribosomas cambia en los diferentes estados funcionales, poniendo de manifiesto la naturaleza dinámica del proceso de traducción. También se han aprendido muchas cosas sobre la importancia y la localización de los componentes de RNA de las subunidades. Por ejemplo, aproximadamente un tercio del rRNA 16*S* es responsable de producir una proyección plana, denominada plataforma, hacia el interior de la subunidad pequeña 30S, que modula el movimiento del complejo mRNA-tRNA durante la translocación.

Se dispone de más información que apoya el concepto de que el RNA es el «jugador» real durante la traducción. La interfaz entre las dos subunidades, considerada como el lugar del ribosoma en el que se produce la polimerización, se compone casi exclusivamente de RNA. En cambio, las numerosas proteínas ribosómicas se encuentran en su mayoría en la periferia del ribosoma. Estas observaciones confirman lo predicho en base a pruebas genéticas, que los pasos catalíticos que unen los aminoácidos durante la traducción se producen bajo la dirección del RNA, no de las proteínas.

Otro hallazgo interesante es la localización real de los tres sitios predichos para albergar los tRNA durante la traducción. Se han identificado todos ellos, los sitios aminoacil, peptidil y de escape (designados como sitios P, A y E), y en cada caso el RNA del ribosoma establece contactos directos con los distintos lazos y dominios de la molécula de tRNA. Esta observación indica la importancia de las diferentes regiones del tRNA, y ayuda a entender por qué durante la evolución se ha conservado la conformación tridimensional específica de todas las moléculas de tRNA.

Otra observación relevante es los sitios A, P y E se encuentras separados al menos 20 Å, y tal vez hasta 50 Å, lo que define la distancia atómica que las moléculas de tRNA deben desplazarse en cada suceso de translocación. Se considera que esta distancia es bastante grande en comparación con el tamaño de los propios tRNA. Los análisis han permitido identificar los puentes moleculares (RNA-proteína) que existen entre los tres sitios implicados en los sucesos de translocación. Se encuentran otros puentes como estos en otros sitios clave, que han sido relacionados con la función del ribosoma. Estas observaciones nos proporcionan una imagen mucho mejor de los cambios dinámicos que deben ocurrir dentro del ribosoma durante la traducción.

Una observación final nos transporta 50 años atrás, cuando Francis Crick propuso la **hipótesis del tambaleo**, que se introdujo en el Capítulo 13. El grupo de Ramakrishnan ha situado la localización precisa en el rRNA 16*S* de la subunidad 30*S* que está implicado en el paso de descodificación del mRNA al tRNA. Dos nucleótidos concretos del rRNA 16*S* realmente enloquecen y prueban la región codón:anticodón; y se cree que examinan la exactitud del emparejamiento de bases durante esta interacción. Relacionado con la hipótesis del tambaleo, la astringencia de este paso es elevada para las dos primeras bases, pero menor (o tambaleante) para el tercer par de bases.

Si bien estos hallazgos representan estudios de referencia, todavía quedan muchas cuestiones relativas a la estructura y la función de los ribosomas. En concreto, todavía debe clarificarse la función de muchas de las proteínas ribosómicas. No obstante, el modelo que emerge basado en el trabajo de Noller, de Ramakrishnan y de sus colaboradores nos proporciona una comprensión mucho mayor del mecanismo de traducción.

14.4 La traducción es más compleja en los eucariotas

Las características generales del modelo que acabamos de presentar provienen de investigaciones de la traducción en bacterias. Como acabamos de ver, una de las principales diferencias entre la traducción en procariotas y en eucariotas es que en estos últimos la traducción se realiza en ribosomas más grandes, y cuyos componentes de rRNA y proteicos son más complejos que los procarióticos. (Véase la Figura 14.1.) Otra diferencia importante es que mientras en los procariotas la transcripción y la traducción se encuentran emparejadas, en los eucariotas estos dos procesos se encuentran temporal y espacialmente se-

parados. En las células eucariotas la transcripción se produce en el núcleo y la traducción en el citoplasma. Esta separación proporciona a las células eucariotas múltiples oportunidades para regular la expresión génica.

Hay otras diferencias que también son importantes. El mRNA eucariótico tiene una vida más larga que su correspondiente procariótico. La mayoría existe durante horas en vez de minutos antes de ser degradado por nucleasas celulares, permaneciendo mucho más tiempo disponible para la orquestada síntesis proteica.

En eucariotas, hay diversos aspectos diferentes durante la iniciación de la traducción. Primero, como dijimos al tratar la maduración del mRNA, se añade una caperuza de 7-metilguanosina al extremo 5′. La presencia de esta caperuza, ausente en los procariotas, es esencial para una traducción eficiente puesto que los RNA que carecen de ella se traducen mal. Además, la mayoría de los mRNA eucarióticos contienen una corta secuencia de reconocimiento alrededor del codón de iniciación, 5′-ACCAUGG. Denominada secuencia Kozak en homenaje a su descubridora, Marilyn Kozak, esta secuencia funciona durante la iniciación generando el contexto adecuado cerca del codón AUG de iniciación. Si falta la secuencia Kozak, el tRNA de iniciación no selecciona el codón AUG y continua rastreando el mRNA hasta que encuentra otro AUG que esté «en el contexto» de esta secuencia. De este modo, se encuentra en una posición similar a la secuencia de Shine-Dalgarno en el mRNA procariótico, pero funciona de distinta forma. No obstante, ambas facilitan la unión inicial del mRNA a la subunidad pequeña del ribosoma.

Otra diferencia es que la iniciación de la traducción en eucariotas no precisa el aminoácido formilmetionina. Sin embargo, como en los procariotas, el triplete AUG, que codifica metionina, es esencial para la formación del complejo de traducción, y durante la iniciación se utiliza un RNA de transferencia especial ($tRNA_i^{met}$).

Los eucariotas poseen factores proteicos parecidos a los procarióticos para dirigir la iniciación, la elongación y la terminación de la traducción. Muchos de estos factores eucarióticos son claramente homólogos a sus correspondientes procarióticos. Sin embargo, generalmente se precisa un mayor número de factores en cada uno de estos pasos, y algunos son más complejos que en los procariotas.

Finalmente, recuerde que los ribosomas citoplasmáticos de los eucariotas se encuentran tanto como ribosomas citosólicos que «flotan libremente», como ribosomas «unidos a membrana» en asociación con las membranas que forman el retículo endoplasmático [formando lo que se denomina retículo endoplasmático (ER) rugoso]. La única diferencia entre estos dos grupos de ribosomas es el tipo de polipéptidos que traducen. La asociación de ribosomas con el ER facilita el transporte de las proteínas recién sintetizadas directamente desde los ribosomas hasta los canales del retículo endoplasmático. Estudios recientes utilizando microscopia crioelectrónica han establecido cómo sucede. En la subunidad grande de los ribosomas hay un túnel que empieza cerca del punto en que se relacionan las dos subunidades, y que termina cerca de la parte trasera de la subunidad grande. Se cree que la localización del túnel dentro de la subunidad grande proporciona el conducto para que la cadena polipeptídica recién sintetizada salga del ribosoma. En estudios realizados en levadura, los polipéptidos recién sintetizados entran en el ER a través de un canal de membrana formado por una proteína específica, Sec61. Este canal se encuentra perfectamente alineado con el punto de salida del túnel ribosómico. En los procariotas, el ribosoma libera los polipéptidos directamente al citoplasma.

14.5 La primera idea de que las proteínas son importantes para la herencia provino del estudio de los errores congénitos del metabolismo

Ahora vamos a considerar cómo sabemos que las proteínas son el producto final de la expresión génica. La primera idea de la función de las proteínas en los procesos genéticos provino de las observaciones hechas por Sir Archibald Garrod y William Bateson a principios del siglo XX. Garrod pertenecía a una familia inglesa de científicos. Su padre era un médico muy interesado en las bases químicas de la artritis reumatoide, y su hermano mayor era un eminente zoólogo londinense. No es sorprendente, pues, que como médico activo, Garrod se interesara por diversas enfermedades humanas que parecían hereditarias. Aunque también estudió el albinismo y la cistinuria, describiremos sus investigaciones de la enfermedad de la **alcaptonuria**. Los individuos afectados no pueden metabolizar el alcaptón ácido 2,5-dihidroxifenilacético, también conocido como ácido homogentísico. En consecuencia, se obstruye una importante ruta metabólica (Figura 14.10). El ácido homogentísico se acumula en las células y tejidos y se excreta por la orina. Los productos de la oxidación de la molécula son negros y fácilmente detectables en los pañales de los recién nacidos. Estos productos tienden a acumularse en las zonas cartilaginosas, provocando el oscurecimiento de las orejas y de la nariz. Estas deposiciones conducen a una condición de artritis benigna en las articulaciones. Esta enfermedad poco frecuente no es grave, pero persiste durante toda la vida del individuo.

Garrod estudió la alcaptonuria incrementando la cantidad de proteínas en la dieta o añadiendo a ésta los aminoácidos fenilalanina o tirosina, ambos relacionados químicamente al ácido homogentísico. Bajo estas condiciones, el nivel de ácido homogentísico se incrementa en la orina de los alcaptonúricos, pero no en los individuos no afectados. Garrod concluyó que los individuos normales pueden romper, o catabolizar, este alcaptón, mientras que los afectados no pueden. Estudiando el patrón de herencia de esta enfermedad, Garrod concluyó, además, que la alcaptonuria se hereda como un carácter recesivo simple.



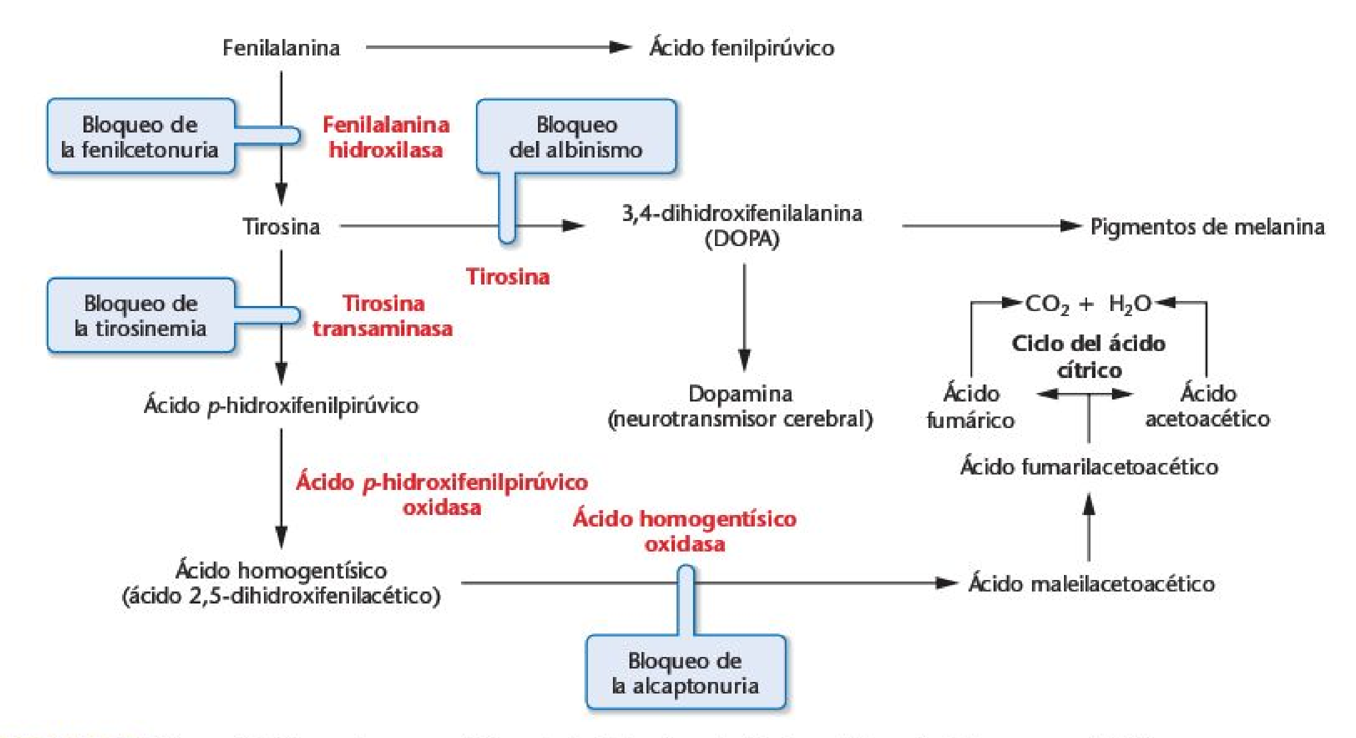


FIGURA 14.10 Ruta metabólica en la que participan la fenilalanina y la tirosina. Diferentes bloqueos metabólicos como consecuencia de mutaciones provocan la fenilcetonuria, la alcaptonuria, el albinismo y la tirosinemia.

Basándose en estas conclusiones, Garrod hipotetizó que la información hereditaria controla las reacciones químicas del organismo, y que las enfermedades hereditarias que estudió son el resultado de formas alternativas del metabolismo. Como los términos *gen* y *enzima* no eran comunes en la época de Garrod, utilizó los conceptos correspondientes de *factores* y *fermentos*. Garrod publicó sus observaciones iniciales en 1902.

Sólo unos pocos genéticos, entre los que estaba Bateson, estaban familiarizados con los experimentos de Garrod o se remitieron a ellos. Las ideas de Garrod encajaban bien con la creencia de Bateson de que las condiciones hereditarias estaban causadas por la falta de alguna sustancia esencial. En 1909, Bateson publicó *Mendel's Principles of Heredity* (*Los Principos de la Herencia de Mendel*), en el que relacionaba a los fermentos con la herencia. Sin embargo, durante casi 30 años, la mayoría de los genéticos no vieron las relaciones entre genes y enzimas. Garrod y Bateson, como Mendel, se adelantaron a su tiempo.

Fenilcetonuria

La **fenilcetonuria (PKU)**, una enfermedad metabólica hereditaria de los humanos, se produce cuando se bloquea otra reacción de la ruta que se muestra en la Figura 14.10. Descrita inicialmente en 1934, esta enfermedad puede provocar retraso mental y se hereda como una enfermedad autosómica recesiva. Los individuos afectados no pueden convertir el aminoácido fenilalanina en el aminoácido tirosina. Estas moléculas se diferencian en un solo grupo hidróxilo (OH), que se encuentra en la tirosina pero no en la fenilalanina. La reacción está catalizada por la enzima **fenilalanina hidroxilasa**, inactiva en los individuos afectados y activa en los heterocigotos en un 30 por ciento. La función de esta enzima se localiza en el hígado. Mientras que el nivel normal de fenilalanina en sangre es de 1 mg/100 ml, los fenilcetonúricos presentan niveles de hasta 50 mg/100 ml.

Al acumularse la fenilalanina, ésta puede convertirse en ácido fenilpirúvico y, posteriormente, en otros derivados. Éstos son reabsorbidos en el riñón con mucha menos eficiencia y tienden a verterse en la orina más lentamente que la fenilalanina. Tanto la fenilalanina como sus derivados entran en el fluido cefalorraquídeo, lo que provoca niveles elevados en el cerebro. Se cree que la presencia de estas sustancias durante el desarrollo inicial provoca retraso mental.

El retraso mental puede prevenirse si se detecta tempranamente la presencia de niveles altos de PKU en los recién nacidos. Cuando se detecta esta condición en el análisis de sangre de un niño, se le establece un régimen dietético estricto. Una dieta baja en fenilalanina puede reducir los productos derivados como el ácido fenilpirúvico, disminuyendo así las anormalidades que caracterizan a la enfermedad. En todos los estados de los Estados Unidos se realiza el análisis rutinario de los recién nacidos[2]. La fenilcetonuria se da en 1 de cada 11.000 nacimientos.

El conocimiento de enfermedades metabólicas hereditarias como la alcaptonuria y la fenilcetonuria ha provocado una re-

[2] *Nota del traductor:* lo mismo sucede en el Estado Español.

volución en el pensamiento y en la práctica médica. Las enfermedades humanas, que antes se creía que eran debidas sólo a la acción de microorganismos, virus o parásitos invasores, está claro que pueden tener una base genética. Actualmente sabemos que miles de anormalidades fisiológicas están causadas por errores en el metabolismo como resultado de genes mutados. Las enfermedades bioquímicas humanas incluyen a todos los tipos de biomoléculas orgánicas.

14.6 Los estudios en *Neurospora* condujeron a la hipótesis de un gen —una enzima

En dos investigaciones diferentes iniciadas en 1933, George Beadle proporcionó la primera prueba experimental convincente de que los genes son los responsables directos de la síntesis de las enzimas. La primera investigación, realizada en colaboración con Boris Ephrussi, implicaba a los pigmentos oculares de *Drosophila*. Beadle y Ephrussi confirmaron que se puede relacionar a genes mutantes que alteran el color de los ojos de la mosca de la fruta con errores bioquímicos que, con toda probabilidad, implican la pérdida de la función enzimática. Animado por estos descubrimientos, Beadle colaboró entonces con Edward Tatum para investigar mutaciones nutricionales del moho rosa del pan *Neurospora crassa*. Esta investigación condujo a la **hipótesis de un gen:una enzima**.

El análisis de mutantes de Neurospora de Beadle y Tatum

A principios de la década de 1940, Beadle y Tatum eligieron al hongo *Neurospora crassa* para sus experimentos debido a lo mucho que se sabía de su bioquímica y a que se podían inducir y aislar mutaciones de manera relativamente simple. Induciendo mutaciones, obtuvieron cepas que tenían bloqueos genéticos en reacciones esenciales para el crecimiento del organismo.

Beadle y Tatum sabían que *Neurospora* podía fabricar casi todo lo necesario para su desarrollo normal. Por ejemplo, utilizando fuentes básicas de carbono y nitrógeno, este organismo puede sintetizar nueve vitaminas solubles en agua, 20 aminoácidos, diversos pigmentos caroténicos, y todas las purinas y pirimidinas esenciales. Beadle y Tatum irradiaron conidios asexuales (esporas) con rayos X para incrementar la frecuencia de mutación, y permitieron que crecieran en un medio «completo» que contenía todos los factores necesarios para su crecimiento (vitaminas, aminoácidos, etc.). En estas condiciones de crecimiento, una cepa mutante que no podría crecer en un medio mínimo podía crecer gracias a los suplementos presentes en este medio completo enriquecido. Luego se transfirieron todos los cultivos a medio mínimo. Si en el medio mínimo se producía crecimiento, es que los organismos podían sintetizar todos los factores necesarios para su crecimiento, y se concluía que no tenían ninguna mutación. Si no crecían, se concluía que contenían una mutación nutricional, y lo único que faltaba era determinar de qué tipo. En la Figura 14.11(a) se esquematizan ambos casos.

Mediante este procedimiento, se aislaron muchos miles de esporas a las que se hizo crecer en medio completo. En los ensayos posteriores realizados en medio mínimo muchos cultivos no crecieron, lo que indicaba que se había producido una mutación nutricional. Para identificar el tipo de mutación, se mantenía la cepa mutante en una serie de medios mínimos diferentes [Figura 14.11(b) y (c)], conteniendo cada uno diferentes grupos de suplementos, y posteriormente en medios que contenían sólo una de las vitaminas, aminoácidos, purinas o pirimidinas, hasta que se encontraba qué suplemento específico permitía el crecimiento. Beadle y Tatum razonaron que el suplemento que restablecía el crecimiento era la molécula que la cepa mutante no podía sintetizar.

La primera cepa mutante aislada precisaba vitamina B-6 en el medio (piridoxina) para crecer, y la segunda precisaba vitamina B-1 (tiamina). Utilizando el mismo procedimiento, Beadle y Tatum aislaron y estudiaron cientos de mutantes deficientes en la síntesis de otras vitaminas, de aminoácidos, de nucleótidos y de otras substancias.

Lo que encontraron tras probar más de 80.000 esporas convenció a Beadle y Tatum de que genética y bioquímica tienen mucho en común. Parecía probable que cada mutación nutricional causase la pérdida de una actividad enzimática que facilita una reacción esencial en los organismos silvestres. También parecía que se podía encontrar una mutación para casi cada reacción controlada enzimáticamente. Beadle y Tatum habían proporcionado así una prueba experimental convincente para la hipótesis de que **un gen especifica una enzima**, una idea a la que Garrod y Bateson habían aludido 30 años antes. Con algunas modificaciones, este concepto se convirtió en un importante principio de la genética.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos, al estudiar las mutaciones nutricionales de *Neurospora*, que un gen codifica una enzima?

Genes y enzimas: análisis de rutas metabólicas

El concepto de un gen:una enzima y los métodos que lo acompañan se han utilizado para resolver muchos detalles del metabolismo de *Neurospora*, de *Escherichia coli* y de otros diversos microorganismos. Una de las primeras rutas metabólicas que se investigó detalladamente fue la que conduce a la síntesis del aminoácido arginina en *Neurospora*. Estudiando siete cepas mutantes, precisando todas arginina para crecer (arg^-), Adrian Srb y Norman Horowitz pudieron determinar la ruta bioquímica parcial que conduce a la síntesis de esta molécula. Su trabajo ilustra cómo puede utilizarse el análisis genético para conseguir información bioquímica.

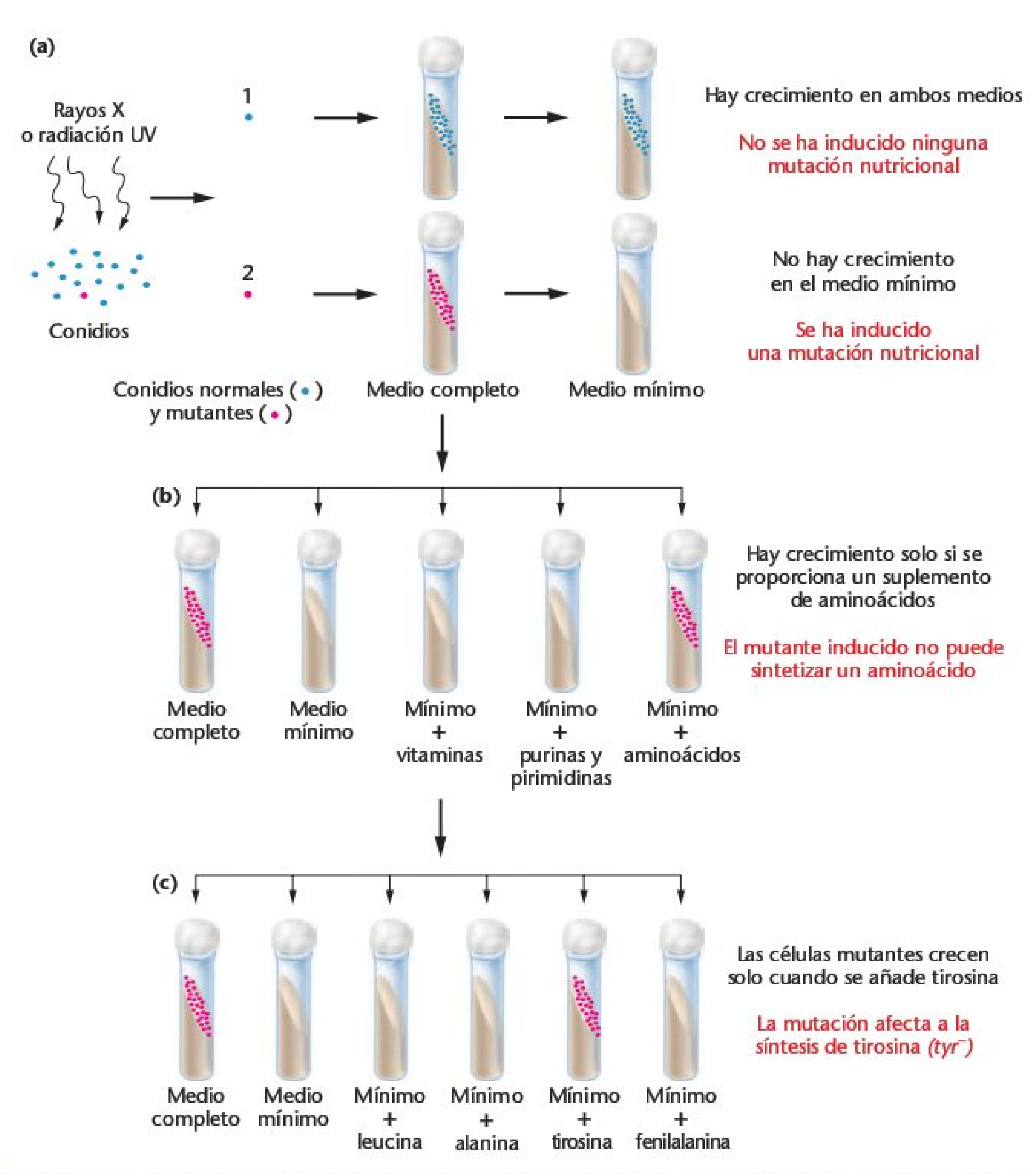


FIGURA 14.11 Inducción, aislamiento y caracterización de una mutación nutricional auxotrófica en *Neurospora*. En (a), la mayoría de los conidios no están afectados, excepto un conidio (que se muestra en color rojo) que contiene dicha mutación. En (b) y en (c) se determinan las características precisas de la mutación, que está implicada en la biosíntesis de la tirosina.

Srb y Horowitz probaron la capacidad de cada cepa mutante de restablecer el crecimiento si se utilizaba citrulina u ornitina, dos compuestos químicamente muy similares a la arginina, como suplemento para el medio mínimo. Razonaron que, si cualquiera de ellas podía sustituir a la arginina es que debía estar implicada en la ruta biosintética de esta molécula[3]. Encontraron que ambas moléculas podían sustituirla en más de una cepa.

De las siete cepas mutantes, cuatro (*arg 4-7*) crecían tanto si se les suministraba citrulina como ornitina o arginina. Dos de ellas (*arg 2* y *3*) crecían si se les suministraba citrulina o arginina. Una cepa (*arg1*) crecía solo si se le suministraba arginina; ni la citrulina ni la ornitina podían sustituirla. De estas observaciones experimentales, dedujeron la siguiente ruta metabólica y los consiguientes bloqueos metabólicos:

$$\text{Precursor} \xrightarrow[\text{Enzima A}]{arg\ 4\text{–}7} \text{Ornitina} \xrightarrow[\text{Enzima B}]{arg\ 2\text{–}3} \text{Citrulina} \xrightarrow[\text{Enzima C}]{arg\ 1} \text{Arginina}$$

El razonamiento que apoya estas conclusiones se basa en la siguiente lógica. Si los mutantes *arg 4-7* pueden crecer si se

[3] *Nota del traductor:* ya se sabía que los compuestos relacionados químicamente se convertían unos en otros en las células mediante enzimas.

suministra cualquiera de estas tres moléculas como suplemento al medio mínimo, las mutaciones que no permiten el crecimiento deben provocar un bloqueo metabólico *anterior* a la participación de la ornitina, de la citrulina o de la arginina en la ruta metabólica. Cuando se añade cualquiera de estas tres moléculas, su presencia supera el bloqueo. En consecuencia, se puede concluir que tanto la citrulina como la ornitina están implicadas en la biosíntesis de la arginina. Sin embargo, con estos datos no puede determinarse su secuencia de participación en la ruta.

Por otra parte, los mutantes *arg 2* y *3* crecen si se les suministra citrulina pero no si se les suministra ornitina. Por lo tanto, la ornitina debe participar en la ruta *antes* del bloqueo. Su presencia no superará el bloqueo metabólico. La citrulina, sin embargo, supera el bloqueo, por lo que debe estar implicada más allá de este punto. Por lo tanto, la conversión de ornitina en citrulina representa la secuencia correcta de la ruta.

Finalmente, se puede concluir que *arg 1* representa la mutación que evita la conversión de citrulina en arginina. Ni la ornitina ni la citrulina pueden superar el bloqueo metabólico ya que ambas participan en puntos anteriores de la ruta.

En conjunto, estos razonamientos apoyan la secuencia biosintética mostrada. Desde el trabajo de Srb y Horowitz, realizados en 1944, se ha descrito la ruta metabólica detallada y se han caracterizado las enzimas que controlan cada paso. En la Figura 14.12 se muestra el resumen de la ruta metabólica.

Ahora resuelva esto

El Problema 14.12 de la página 410 le pide que analice unos datos para establecer una ruta bioquímica en la bacteria *Salmonella*.

Sugerencia: Utilice los mismos principios y aproximaciones usados para descifrar las rutas bioquímicas en *Neurospora*.

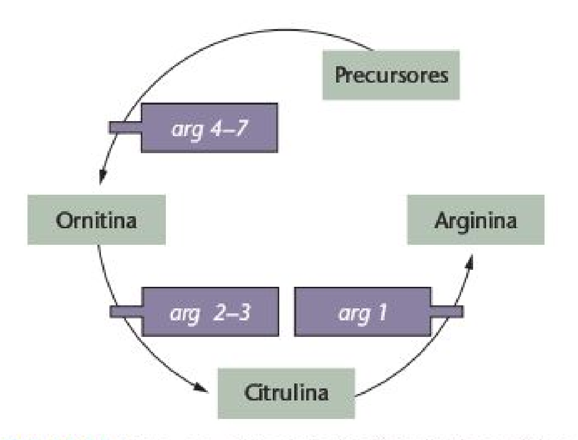


FIGURA 14.12 Ruta resumida de la biosíntesis de arginina en *Neurospora*.

14.7 Los estudios de la hemoglobina humana establecieron que un gen codifica una cadena polipeptídica

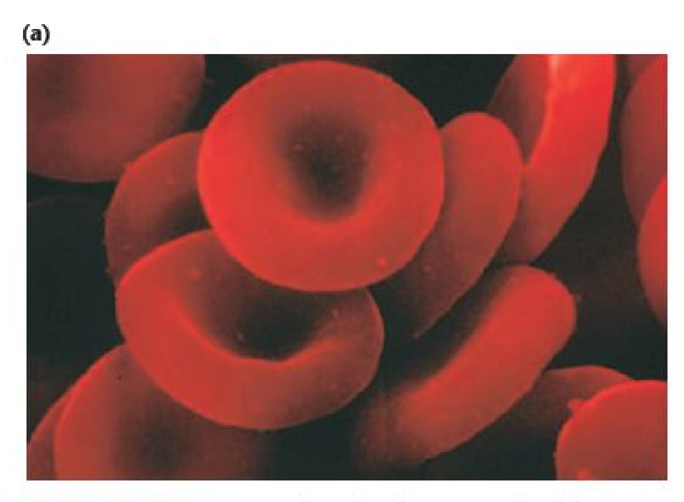
No todos los genéticos aceptaron inmediatamente el concepto de un gen:una enzima desarrollado a principios de la década de 1940. Esto no es sorprendente, ya que todavía no estaba claro cómo las enzimas mutantes podían causar la variación de tantos caracteres fenotípicos. Por ejemplo, los mutantes de *Drosophila* mostraban alteraciones del tamaño de los ojos, de la forma de las alas, del patrón de las venas del ala, etc. Las plantas mostraban variedades mutantes de la textura de las semillas, de su altura y del tamaño de los frutos. Para muchos genéticos resultaba confuso cómo una enzima mutante inactiva podía provocar tales fenotipos.

Dos factores modificaron pronto la hipótesis de un gen:una enzima. Primero, aunque casi todas las enzimas son proteínas, no todas las proteínas son enzimas. Al proseguir la experimentación en genética bioquímica, se hizo evidente que todas las proteínas están especificadas por la información almacenada en los genes, lo que condujo a la terminología más precisa de **un gen:una proteína**. Segundo, a menudo se había mostrado que las proteínas tienen una estructura en subunidades formada por dos o más cadenas polipeptídicas. Esta es la base de la estructura cuaternaria de las proteínas, que se tratará más adelante en este mismo capítulo. Puesto que cada cadena polipeptídica diferente está codificada por un gen distinto, una afirmación más moderna del principio básico de Beadle y Tatum es **un gen:una cadena polipetídica**. Estas modificaciones de la hipótesis original se hicieron aparentes durante el análisis de la estructura de la hemoglobina en individuos afectados de anemia falciforme.

Anemia falciforme

La primera prueba directa de que los genes especifican para otras proteínas distintas a las enzimas vino de los experimentos en moléculas mutantes de hemoglobina provenientes de humanos afectados de la enfermedad denominada **anemia falciforme**. Los individuos afectados contienen eritrocitos que, en condiciones de baja tensión de oxígeno, adquieren una forma curvada y alargada debido a la polimerización de la hemoglobina. La forma de «hoz» de estos eritrocitos contrasta con la forma de disco bicóncavo característico de los individuos normales (Figura 14.13). Los individuos con la enfermedad sufren ataques cuando los glóbulos rojos sanguíneos se agregan en el lado venoso del sistema capilar, donde la tensión de oxígeno es muy baja. En consecuencia, distintos tejidos pueden verse privados de oxígeno y sufrir daños importantes. Cuando esto ocurre, se dice que el individuo sufre una crisis falciforme. Si no se trata, la crisis puede ser mortal. Pueden resultar afectados los riñones, los músculos, las articulaciones, el cerebro, el conducto gastrointestinal y los pulmones.

(a)



(b)



FIGURA 14.13 Eritrocitos de individuos normales (a) comparados con eritrocitos de individuos con anemia falciforme (b).

Además de sufrir crisis, estos individuos son anémicos debido a que sus eritrocitos se destruyen más rápidamente que los glóbulos rojos normales. Mecanismos fisiológicos compensadores causan un incremento de la producción de glóbulos rojos por parte de la médula ósea y un incremento del trabajo cardíaco. Estos mecanismos conducen a un tamaño y a una forma anormal de los huesos y a la dilatación del corazón.

En 1949, James Neel y E. A. Beet demostraron que la enfermedad se hereda como un carácter mendeliano. Análisis de árboles genealógicos revelaron la presencia de tres genotipos y de tres fenotipos controlados por un par de alelos, Hb^A y Hb^S. Los individuos normales y afectados son consecuencia de los genotipos Hb^AHb^A y Hb^SHb^S, respectivamente. Los glóbulos rojos sanguíneos del heterocigoto, que muestra el **carácter falciforme** (en forma de hoz) pero no la enfermedad, presentan un fenotipo en forma de «hoz» mucho menos acusado ya que más de la mitad de su hemoglobina es normal. Aunque prácticamente no padecen la enfermedad, los heterozigotos son «portadores» del gen defectuoso, que transmiten, como promedio, al 50 por ciento de su descendencia.

Ese mismo año, Linus Pauling y sus colaboradores proporcionaron la primera idea de la base molecular de la enfermedad. Demostraron que la velocidad de migración de la hemoglobina aislada de individuos enfermos y de normales era diferente. En esta técnica (que se describe en el Capítulo 10) las partículas cargadas migran en un campo eléctrico. Si la carga neta de dos moléculas es diferente, su velocidad de migración será diferente. Pauling y sus colaboradores concluyeron que hay una diferencia bioquímica entre la hemoglobina normal y la falciforme. Actualmente estas dos moléculas se denominan $\mathbf{Hb^A}$ y $\mathbf{Hb^S}$, respectivamente.

La Figura 14.14(a) esquematiza el patrón de migración de hemoglobina proveniente de individuos de los tres posibles genotipos mediante una **electroforesis en gel de almidón**. El gel proporciona la matriz para la migración de la molécula. En este experimento, las muestras se colocan en un punto de origen situado entre el cátodo (−) y el ánodo (+), y el conjunto se somete a un campo eléctrico. El patrón de migración revela que todas las moléculas se mueven hacia el ánodo, lo que indica que están cargadas negativamente. Sin embargo, HbA migra más rápido que HbS, sugiriendo que su carga neta negativa es mayor. El patrón de electroforesis de la hemoglobina que proviene de individuos portadores revela la presencia de ambas hemoglobinas (HbA y HbS), confirmando así su genotipo heterozigótico.

Los descubrimientos de Pauling sugirieron dos posibilidades. Se sabía que la hemoglobina estaba formada por cuatro grupos hemo no proteicos que contienen hierro y por una parte de globina formada por cuatro cadenas polipeptídicas. En teoría, la alteración de la carga neta de la HbS podría deberse a un cambio químico en cualquiera de sus componentes.

Investigaciones realizadas entre 1954 y 1957 por Vernon Ingram aportaron la solución. Este investigador demostró que el cambio químico se encuentra en la estructura primaria de la parte globina de la molécula de hemoglobina. Usando la **técnica de la huella molecular**, Ingram demostró que la composición de aminoácidos de la HbS difiere de la de HbA. La hemoglobina humana adulta contiene, en su estructura cuaternaria, dos cadenas alfa (α) idénticas de 141 aminoácidos y dos cadenas beta (β) de 146 aminoácidos también idénticas.

La técnica de la huella molecular implica la digestión enzimática de la proteína en fragmentos peptídicos. La mezcla se coloca en un papel absorbente y se somete a un campo eléctrico, en el que se produce migración en función de la carga neta. Luego se gira el papel 90° y se coloca en un solvente, en el que la acción cromatográfica provoca la migración de los péptidos en una segunda dirección. El resultado final es una separación bidimensional de los fragmentos peptídicos en un patrón característico de manchas o «huellas moleculares». El experimento de Ingram reveló que la HbS y la HbA se diferencian en uno solo de sus fragmentos peptídicos [Figura 14.14(b)]. Aná-

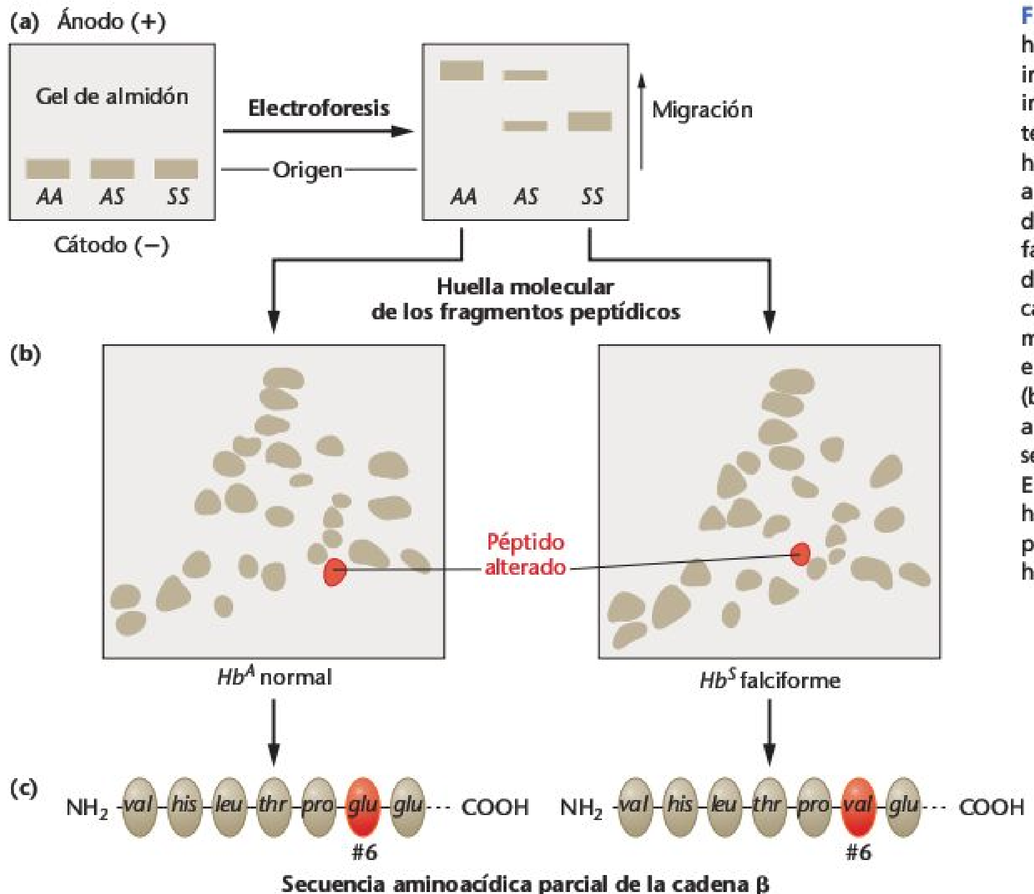


FIGURA 14.14 Análisis de hemoglobina proveniente de individuos Hb^AHb^A y de individuos Hb^SHb^S mediante técnicas electroforéticas, de huella molecular y de análisis de aminoácidos. La hemoglobina de los individuos con anemia falciforme (Hb^SHb^S) presenta diferente migración en un campo electroforético (a), muestra un péptido alterado en el análisis de la huella molecular (b) y tiene un aminoácido alterado (c), una valina en la sexta posición de la cadena b. En la electroforesis, los heterocigotos (Hb^AHb^S) presentan ambas formas de hemoglobina.

lisis posteriores revelaron un cambio en un sólo aminoácido: en la sexta posición de la cadena β, una valina está sustituyendo a un ácido glutámico, justificando así la diferencia del péptido[4] [Figura 14.14(c)].

La importancia de este descubrimiento es plural. Establece claramente que un único gen proporciona la información genética para una cadena polipeptídica. Estudios de la HbS también demuestran que una mutación puede afectar al fenotipo dirigiendo la sustitución de un sólo aminoácido. Además, al proporcionar la explicación de la anemia falciforme, se estableció el concepto de **enfermedad molecular** hereditaria. Finalmente, este trabajo condujo a la investigación de todas las hemoglobinas humanas, que ha proporcionado valiosas ideas genéticas.

En los Estados Unidos, la anemia falciforme se encuentra casi exclusivamente en la población afroamericana. Afecta a uno de cada 625 recién nacidos de esta población. Actualmente, hay entre 50.000 y 75.000 individuos afectados. Aproximadamente en una de cada 145 parejas afroamericanas, ambos cónyuges son portadores. En estos casos, cada uno de sus hijos tiene el 25 por ciento de probabilidades de tener la enfermedad[5].

Las hemoglobinas humanas

Después de introducir las hemoglobinas humanas en su contexto histórico, puede ser de utilidad extender este tema y proporcionar datos actualizados de lo que se conoce sobre estas moléculas en nuestra especie. Análisis moleculares revelan que en la especie humana se producen diferentes moléculas de hemoglobina. Todas son tetraméricas y están formadas por varias combinaciones de siete cadenas polipeptídicas diferentes, cada una codificada por un gen distinto. La expresión de estos genes está regulada durante el desarrollo.

Casi toda la hemoglobina adulta es **HbA**, que contiene dos **cadenas alfa (α)** y dos **cadenas beta (β)**. Recuerde que la mu-

[4] *Nota del traductor:* el ácido glutámico tiene una carga neta negativa, mientras que la valina es neutra (véase la Figura 14.16, página 350). Esto explica que la HbA avance más rápidamente en un campo electroforético, ya que tiene una carga neta negativa mayor.

[5] *Nota del traductor:* a menudo, la elevada incidencia de este carácter en la población afroamericana se ha justificado por una posible ventaja selectiva de los individuos heterocigotos frente a una enfermedad parasitaria. Esta enfermedad, la malaria, es frecuente en zonas tropicales, como en ciertas zonas de África. En este sentido, se ha considerado a menudo que los individuos heterocigotos Hb^AHb^S podrían tener una cierta protección natural contra esta enfermedad.

tación que provoca la anemia falciforme está en la cadena β. La HbA representa el 98 por ciento de la hemoglobina total encontrada en los eritrocitos de un individuo de más de seis meses de edad. El 2 por ciento restante es **HbA_2**, un componente minoritario de los adultos. Esta molécula contiene dos cadenas α y dos **cadenas delta (δ)**. La cadena delta es muy parecida a la beta y está formada por 146 aminoácidos.

Durante el desarrollo embrionario y fetal se encuentra un grupo de hemoglobinas diferente. El primero en producirse es el denominado **Gower 1**, que contiene dos **cadenas zeta (ζ)** muy parecidas a las cadenas α y dos **cadenas epsilon (ϵ)** muy parecidas a las cadenas β. A las ocho semanas de gestación, otra molécula de hemoglobina con cadenas diferentes reemplaza gradualmente a esta forma embrionaria. Esta molécula se denomina **HbF**, o **hemoglobina fetal**, y está formada por dos cadenas α y por dos **cadenas gamma (γ)**. Hay dos tipos de cadenas gamma, denominadas ${}^{G}\gamma$ y ${}^{A}\gamma$. Ambas son muy parecidas a la cadena β, y se diferencian entre ellas por un sólo aminoácido. En la Tabla 14.2 se resume la nomenclatura y la secuencia de aparición de los cinco tetrámeros que se han descrito.

TABLA 14.2 CADENAS QUE FORMAN LA HEMOGLOBINA HUMANA DESDE LA CONCEPCIÓN HASTA LA EDAD ADULTA

Tipo de hemoglobina	Cadenas que las forman
Gower 1-embrionaria	$\zeta_2\epsilon_2$
HbF-fetal	$\alpha_2{}^{G}\gamma_2$
	$\alpha_2{}^{A}\gamma_2$
HbA-adulta	$\alpha_2\beta_2$
HbA_2-adulta minoritaria	$\alpha_2\delta_2$

14.8 La secuencia nucleotídica de un gen y la secuencia aminoacídica de la proteína correspondiente son colineares

Una vez se hubo establecido que los genes especifican la síntesis de cadenas polipeptídicas, la siguiente pregunta lógica fue cómo la información genética contenida en la secuencia nucleotídica de un gen puede transferirse a la secuencia aminoacídica de una cadena polipeptídica. Parecía que lo más probable era que existiese una relación colinear (el concepto de **colinearidad**) entre ambas moléculas. Es decir, que el orden de nucleótidos en el DNA de un gen se correlacionase directamente con el orden de aminoácidos del correspondiente polipéptido.

La primera prueba experimental que apoyaba este concepto provino de los experimentos de Charles Yanofsky del gen *trpA*, que codifica la subunidad A de la enzima **triptófano sintetasa** de *E. coli*. Yanofsky aisló muchos mutantes independientes que habían perdido esta actividad enzimática, los cartografió y estableció sus localizaciones respectivas dentro del gen. Entonces determinó donde se había producido la sustitución aminoacídica en cada proteína mutante. Cuando comparó los dos grupos de datos, la relación colinear se hizo evidente. La localización de cada mutación en el gen *trpA* se correlaciona con la posición del aminoácido alterado en el polipéptido A de la triptófano sintetasa. Esta comparación se esquematiza en la Figura 14.15

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué información experimental apoya el concepto de colinearidad, según el cual hay una correspondencia directa entre la secuencia nucleotídica de un gen y la secuencia aminoacídica de su correspondiente cadena polipeptídica?

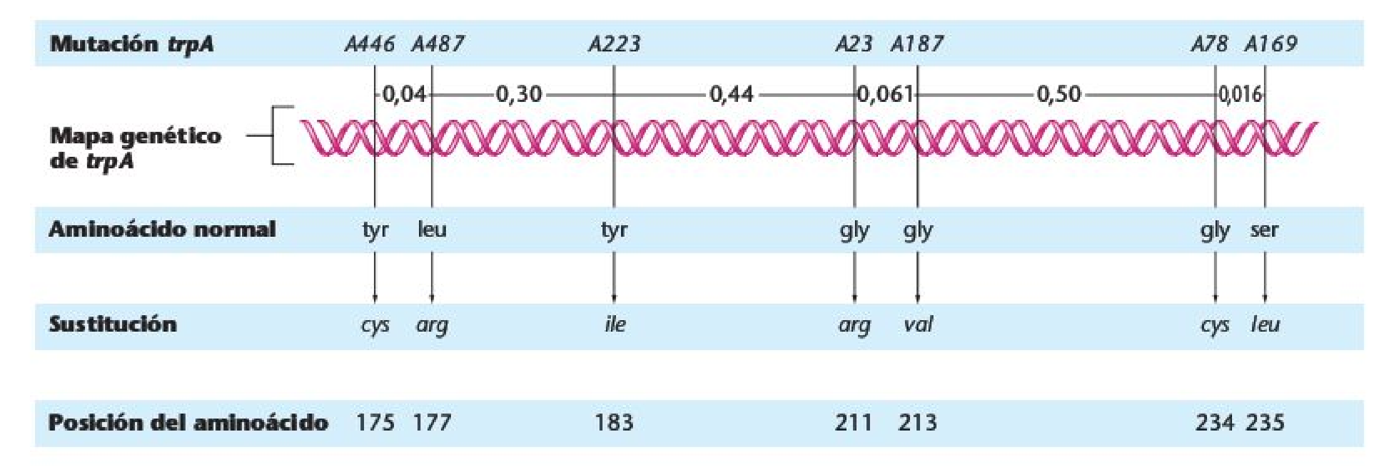


FIGURA 14.15 Demostración de la colinearidad entre el mapa genético de diversas mutaciones *trpA* de *E. coli* y los aminoácidos afectados del producto proteico. Los números que hay entre las mutaciones representan las distancias de ligamiento.

14.9 La estructura proteica es la base de la diversidad biológica

Después de haber establecido que la información genética se almacena en el DNA y que ésta influye en las actividades celulares mediante las proteínas que codifica, vamos a tratar ahora la estructura y la función de las proteínas. ¿Cómo pueden estas moléculas desempeñar una función tan importante en la determinación de la complejidad de las actividades celulares? Como veremos, los aspectos fundamentales de la estructura de las proteínas proporciona la base para una increíble complejidad y diversidad. Primero debemos diferenciar entre los términos **polipéptido** y **proteína**. Ambos describen moléculas formadas por aminoácidos. Sin embargo, se diferencian en su estado de ensamblaje y en su capacidad funcional. Los *polipéptidos* son los precursores de las proteínas, tal como se sintetizan en el ribosoma durante la traducción. Después de la traducción, cuando se liberan del ribosoma, el polipéptido se dobla y adquiere una estructura de orden superior. Cuando esto se produce, adquiere una conformación espacial tridimensional y, en muchos casos, diversos polipéptidos interaccionan para producir esta conformación. Cuando se adquiere la conformación final, la molécula, que ahora es completamente funcional, se denomina propiamente *proteína*. Es esta conformación tridimensional lo que es esencial para la funcionalidad de la molécula.

Las cadenas polipeptídicas de las proteínas, como los ácidos nucleicos, son polímeros lineales no ramificados. Hay 20 aminoácidos que sirven de subunidades (las piezas de construcción) para las proteínas. Cada aminoácido tiene un **grupo carboxilo**, un **grupo amino** y un **grupo radical** (**R**, en una cadena lateral), unidos covalentemente a un **átomo de carbono central**. El grupo R es el que proporciona la identidad química a cada aminoácido. La Figura 14.16 esquematiza los 20 grupos R diferentes, que muestran diversas configuraciones y que pueden dividirse en cuatro clases principales: (1) **no polares (hidrofóbicos)**; (2) **polares (hidrofílicos)**; (3) **cargados negativamente**; y (4) **cargados positivamente**. Puesto que los polipéptidos son a menudo polímeros largos, y ya que cada posición puede estar ocupada por cualquiera de los 20 aminoácidos con propiedades químicas específicas, las posibles variaciones de conformación química y de actividad son inmensas. Por ejemplo, si como promedio un polipéptido estuviese formado por 200 aminoácidos (con un peso molecular aproximado de 20.000 daltons) y se utilizasen los 20 aminoácidos posibles, podrían generarse 20^{200} moléculas diferentes, cada una de ellas con una secuencia específica.

En 1900, el químico alemán Emil Fischer determinó la manera en que los aminoácidos están unidos entre sí. Demostró que el grupo amino de un aminoácido puede reaccionar con el grupo carboxilo de otro aminoácido en una reacción de deshidratación (condensación), en la que se libera una molécula de H_2O. El enlace covalente que se forma se denomina *enlace peptídico* (Figura 14.17). Dos aminoácidos unidos constituyen un dipéptido, tres un tripéptido, etc. Si hay 10 o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, la cadena se denomina *polipéptido*. Normalmente, y sin importar la longitud del polipéptido, éste contiene un grupo amino en un extremo (extremo N-terminal) y un grupo carboxilo en el otro (extremo C-terminal).

Se reconocen cuatro niveles de estructura proteica: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La secuencia lineal de aminoácidos del polipéptido constituye su **estructura primaria**. Esta secuencia está especificada por la secuencia de desoxirribonucleótidos del DNA mediante un intermediario de mRNA. La estructura primaria de un polipéptido ayuda a determinar las características específicas de los órdenes superiores de organización al formarse la proteína.

La **estructura secundaria** hace referencia a la configuración espacial ordenada o repetida que adquieren los aminoácidos estrechamente alineados de la cadena polipeptídica. En 1951, Linus Pauling y Robert Corey predijeron, basándose en fundamentos teóricos, que la **hélice α** es uno de los tipos de estructura secundaria. El modelo de hélice α [Figura 14.18(a)] se ha confirmado mediante estudios de cristalografía de rayos X. Es como una varilla y tiene la mayor estabilidad teórica posible. La hélice está formada por una cadena espiral de aminoácidos, estabilizada por puentes de hidrógeno.

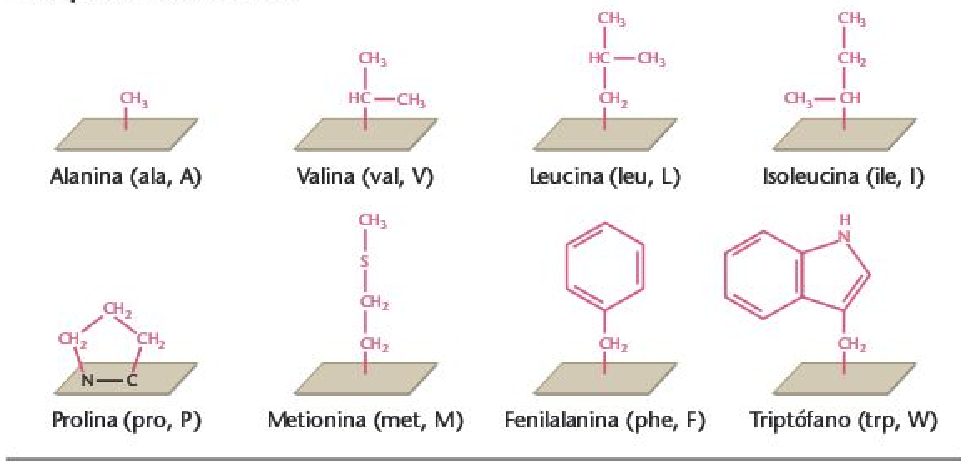
Las cadenas laterales de los aminoácidos (los grupos R) se extienden hacia el exterior de la hélice, y cada residuo aminoacídico ocupa una distancia vertical de 1,5 Å en la hélice. Hay 3,6 residuos por vuelta. A pesar de que las hélices levógiras son teóricamente posibles, todas las proteínas que tienen hélice α son dextrógiras.

También en 1951, Pauling y Corey propusieron una segunda estructura, la configuración en **hoja plegada β**. En este modelo, una sola cadena polipeptídica se dobla sobre sí misma, o varias cadenas discurren de manera paralela o antiparalela una al lado de otra. Cada estructura se estabiliza mediante puentes de hidrógeno que se forman entre átomos de las cadenas adyacentes [Figura 14.18(b)]. Se forma un solo plano zigzagueante, en el que los aminoácidos adyacentes están separados 3,5Å.

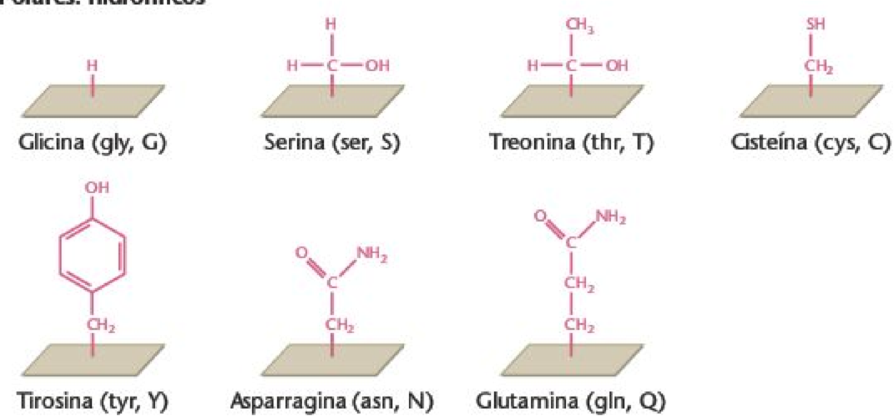
Como norma general, la mayoría de proteínas tienen segmentos de estructura α y segmentos de estructura β. Las proteínas globulares, la mayoría de las cuales tienen forma redondeada y son solubles en agua, contienen generalmente un núcleo de hoja plegada β y muchas zonas con estructura helicoidal. Las proteínas estructurales más rígidas, muchas de las cuales son insolubles en agua, basan su rigidez en regiones más extensas de hoja plegada β. Por ejemplo, la **fibroína**, la proteína que hace el gusano de seda, depende en gran medida de esta estructura secundaria.

Mientras que la estructura secundaria describe la disposición de los aminoácidos en áreas concretas de la cadena polipeptídica, la **estructura terciaria** define la conformación tridimensional de la cadena completa. Cada polipéptido se en-

1. No polares: hidrofóbicos



2. Polares: hidrofílicos

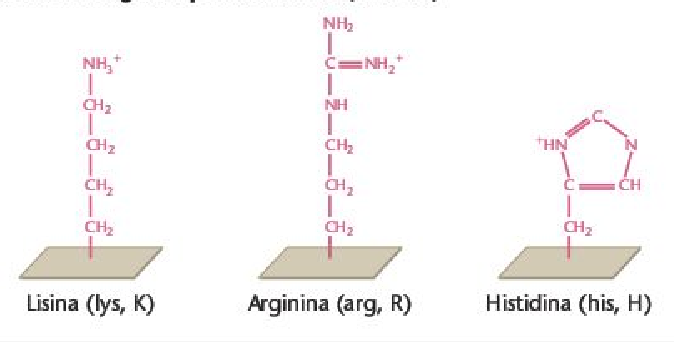


Grupo amino

Grupo carboxilo

Estructura del aminoácido

3. Polares: cargados positivamente (básicos)



4. Polares: cargados negativamente (ácidos)

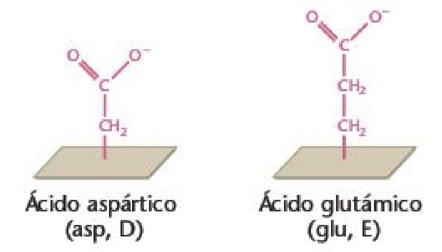


FIGURA 14.16 Estructura química y denominación de los 20 aminoácidos encontrados en los seres vivos, clasificados en cuatro categorías principales.

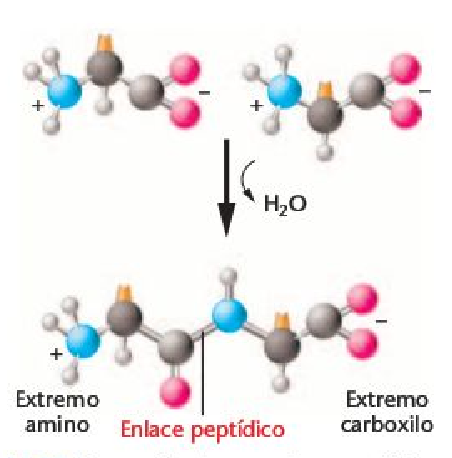


FIGURA 14.17 Formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos como consecuencia de una reacción de deshidratación.

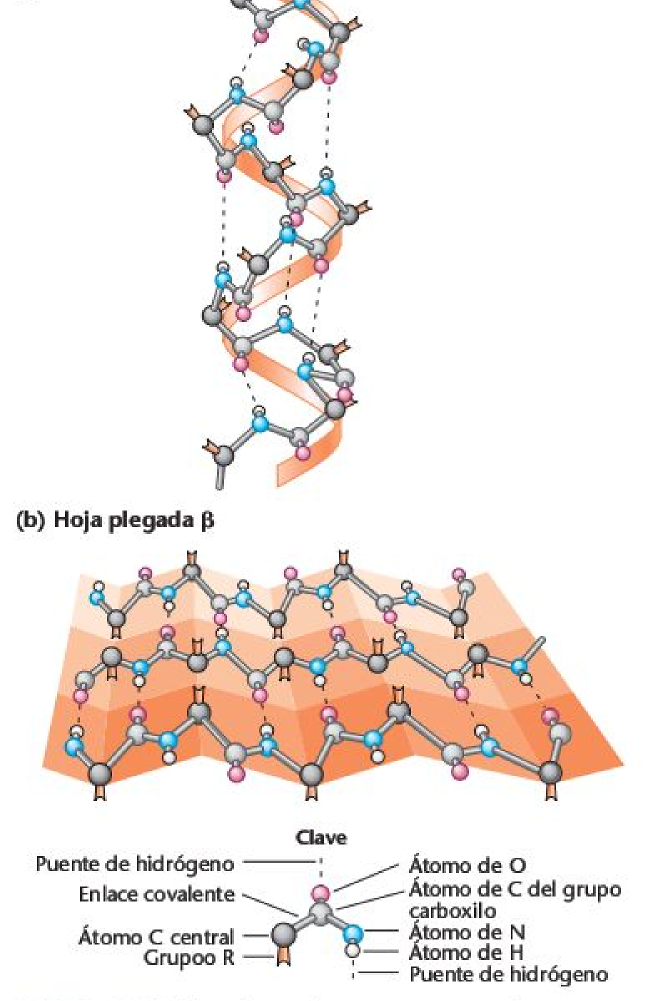


FIGURA 14.18 (a) Hélice α dextrógira, un tipo de estructura secundaria de una cadena polipeptídica. (b) Configuración en hoja plegada β, una forma alternativa de estructura secundaria de las cadenas polipeptídicas. Para mayor claridad, no se muestran algunos átomos.

rosca, se dobla y se riza sobre sí mismo de una manera muy específica, característica de cada proteína concreta. Hay tres aspectos de este nivel de estructuración que son muy importantes para determinar esta conformación y para estabilizar la molécula:

1. Se forman enlaces covalentes disulfuro entre residuos de cisteína que se encuentran estrechamente alineados.
2. Casi todos los grupos R polares hidrofílicos se localizan en la superficie, donde pueden interaccionar con el agua.
3. Generalmente, los grupos R no polares hidrofóbicos están localizados en el interior de la molécula, donde interaccionan entre sí, evitando la interacción con el agua.

Es importante destacar que la conformación tridimensional llevada a cabo por cada proteína es una consecuencia de la estructura primaria del polipéptido. Así, el código genético sólo necesita especificar la secuencia de aminoácidos para codificar la información que en último término conduce al montaje de las proteínas. Los tres factores estabilizantes citados anteriormente dependen de la localización relativa de cada aminoácido en la cadena. Al producirse los plegamientos, se produce la conformación termodinámicamente más estable.

En la Figura 14.19 se muestra un modelo tridimensional de la estructura terciaria de la **mioglobina**, un pigmento respiratorio. Este nivel de organización es extremadamente importante ya que la función específica de toda proteína está relacionada directamente con su conformación tridimensional.

El **nivel de organización cuaternario** implica sólo a las proteínas formadas por más de una cadena polipeptídica, e indica la conformación relativa de las diversas cadenas en la proteína. Este tipo de proteínas se denominan oligoméricas, y cada cadena recibe el nombre de protómero o, de modo menos for-

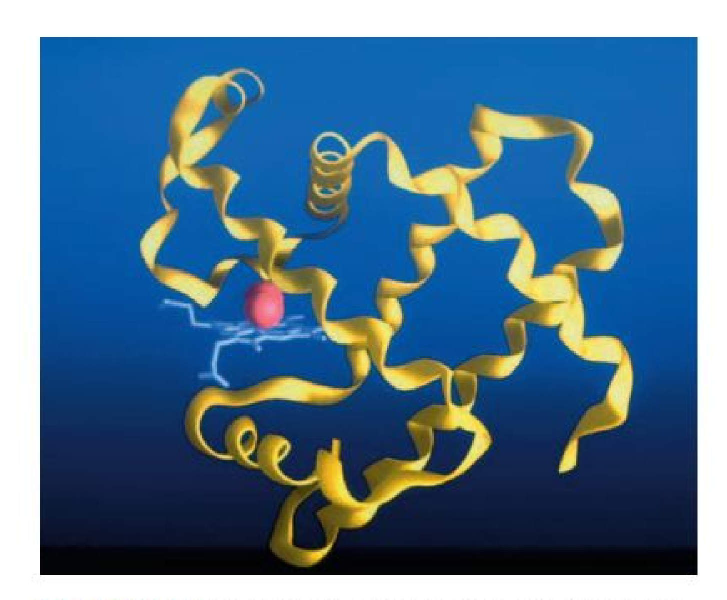


FIGURA 14.19 Nivel terciario de la estructura proteica de la mioglobina, un pigmento respiratorio. En rojo se muestra el átomo de oxígeno unido.

mal, de subunidad. Los protómeros individuales tienen conformaciones que encajan entre sí de manera específica y complementaria. Se ha estudiado con gran detalle la estructura de la hemoglobina, una proteína oligomérica formada por cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas α y dos cadenas β). En la Figura 14.20 se muestra su estructura cuaternaria. La mayoría de enzimas, entre las que se encuentran las DNA y RNA polimerasas, muestran estructura cuaternaria.

Ahora resuelva esto

El Problema 14.31 de la página 412 le pide que considere el impacto potencial de la substitución de diversos aminoácidos debida a mutaciones en uno de los genes que codifican una de las cadenas que forman de la hemoglobina humana.

Sugerencia: Cuando considere los tres aminoácidos (ácido glutámico, lisina y valina), tenga en cuenta la carga neta de cada grupo R.

Las modificaciones postranscripcionales

Antes de tratar de la función de las proteínas es importante remarcar que, a menudo, y como le sucede al RNA, las cadenas polipeptídicas se modifican después de sintetizarse. Estos procesamientos adicionales se denominan, en sentido amplio, **modificaciones postranscripcionales**. Aunque muchas de estas modificaciones son transformaciones bioquímicas que están fuera de los objetivos de esta discusión, debe saber que se producen y que son importantes para la capacidad funcional del producto proteico final. A continuación se presentan varios ejemplos de modificaciones postranscripcionales:

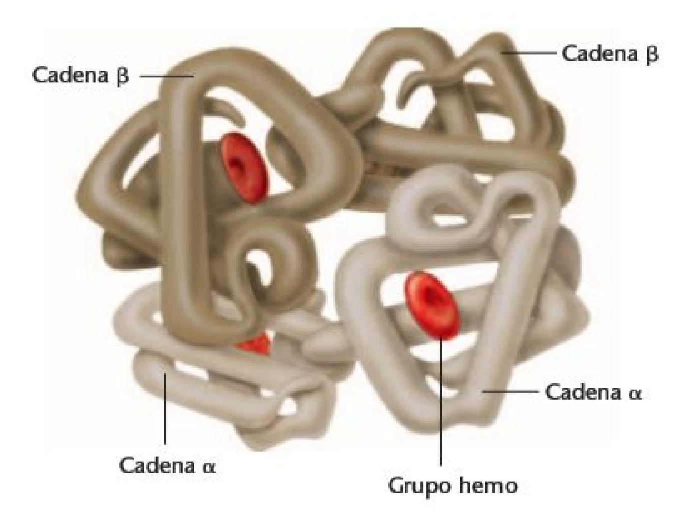


FIGURA 14.20 Nivel cuaternario de la estructura proteica de la hemoglobina. La molécula funcional está formada por cuatro cadenas (2 α y 2 β) que interaccionan con cuatro grupos hemo.

1. *Generalmente se elimina o se modifica el extremo N-terminal.* Por ejemplo, normalmente se elimina enzimáticamente el grupo formil o todo el residuo formilmetionina de los polipéptidos bacterianos. A menudo, en las cadenas polipeptídicas eucarióticas, se elimina el grupo amino del residuo metionina inicial, y el grupo amino del residuo N-terminal se modifica químicamente (se acetila).
2. *Algunas veces se modifican aminoácidos concretos.* Por ejemplo, a algunos aminoácidos como la tirosina se les puede añadir un fosfato al grupo hidroxilo. Las modificaciones como ésta crean residuos cargados negativamente que pueden formar enlaces iónicos con otras moléculas. El proceso de fosforilación es extremadamente importante para regular muchas actividades celulares, y es consecuencia de la acción de unas enzimas denominadas **quinasas**. A otros residuos aminoacídicos se les añade enzimáticamente grupos metilo o grupos acetilo, que pueden afectar de manera parecida a la función de la cadena polipeptídica modificada.
3. *A veces se añaden cadenas laterales de carbohidratos.* Estas cadenas se unen covalentemente formando **glucoproteínas**, una categoría importante de moléculas extracelulares, como las que especifican los antígenos del grupo sanguíneo ABO en humanos.
4. *Las cadenas polipeptídicas pueden recortarse.* Por ejemplo, la insulina se traduce primero en una molécula larga que se recorta enzimáticamente hasta su forma final de 51 aminoácidos.
5. *Se eliminan las secuencias señalizadoras.* En el extremo N-terminal de algunas proteínas hay una secuencia de hasta 30 aminoácidos que desempeña la importante función de dirigir a la proteína hasta la localización celular donde debe actuar. Esta secuencia se denomina **secuencia señal**, y determina el destino final de la proteína en la célula. Este proceso se denomina **domiciliación de la proteína.** Por ejemplo, las proteínas cuyo destino es la secreción o que deben formar parte de la membrana plasmática, dependen de secuencias específicas para su transporte inicial hasta el lumen del retículo endoplasmático. Aunque la secuencia primaria de la secuencia señal de diversas proteínas con un destino común puede diferir, comparten muchas propiedades químicas. Por ejemplo, aquellas cuyo destino es la secreción contienen una cadena de hasta 15 aminoácidos hidrofóbicos precedidos por un aminoácido cargado positivamente situado en el extremo N-terminal de la secuencia señal. Una vez transportado el polipéptido, y antes de alcanzar el estado funcional de proteína, la secuencia señal se elimina enzimáticamente.
6. *A menudo, las cadenas polipeptídicas están acomplejadas con metales.* A menudo, el nivel terciario y cuaternario de la estructura proteica incluye y depende de átomos metálicos. Por lo tanto, la función de la proteína

depende del complejo molecular formado por las cadenas polipeptídicas y por los átomos metálicos. Un buen ejemplo de esto es la hemoglobina, que contiene cuatro átomos de hierro y cuatro cadenas polipeptídicas.

Sin duda, estos distintos tipos de modificación postranscripcional son importantes para la conversión de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas en su conformación tridimensional final. Puesto que la estructura tridimensional de la molécula está estrechamente relacionada a su función específica, un tema importante es cómo en última instancia las cadenas polipeptídicas se pliegan en sus conformaciones finales. Durante muchos años se pensó que el plegamiento de las proteínas era un proceso espontáneo en el que la molécula alcanzaba la máxima estabilidad termodinámica, y que se basaba principalmente en las propiedades inherentes a la secuencia de aminoácidos de la cadena(s) polipeptídica(s) que forman una proteína. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado que, para muchas proteínas, el plegamiento depende de una familia de proteínas ubicuas denominadas **tutores moleculares (*chaperones moleculares o chaperoninas*)**. Los tutores moleculares actúan facilitando el plegamiento de otras proteínas. Aunque no se ha clarificado el mecanismo mediante el que realizan esta función, se sabe que los tutores no se convierten en parte del producto final, como sucede con las enzimas. Descubiertos inicialmente en *Drosophila*, donde se llaman proteínas de choque térmico, se han descubierto este tipo de tutores moleculares en diversos organismos, que incluyen bacterias, animales y plantas. En última instancia, el plegamiento de las proteínas es un proceso crítico, no solo porque las proteínas mal plegadas pueden no ser funcionales, sino también porque las proteínas mal plegadas puedes ser peligrosas. Cada vez está más claro que algunas enfermedades, como la **enfermedad de Alzheimer** en los seres humanos y las encefalopatías espongiformes (como la **enfermedad de las vacas locas** en los bóvidos y la **enfermedad de Creutzefeldt-Jackob** en los humanos) están provocadas por la presencia de proteínas neurales mal plegadas. Actualmente, muchos laboratorios están centrados en intentar entender cómo se produce el plegamiento de las proteínas en condiciones normales, y también en cómo la presencia de proteínas incorrectamente plegadas «envenena» el plegamiento de los polipéptidos normales causando, en última instancia, muerte celular y la enfermedad.

14.10 La función de las proteínas está directamente relacionada con la estructura de la molécula

La esencia de la vida en la Tierra se basa en la diversidad de funciones de las células. Uno puede decir que el DNA y el RNA sirven solamente de vehículos para almacenar y expresar la información genética. Sin embargo, las proteínas son el corazón de las funciones celulares. Y la capacidad de las células de asumir estructuras y funciones diferentes es lo que distingue a la mayoría de los eucariotas de los organismos evolutivamente menos avanzados, como las bacterias. Por lo tanto, la comprensión básica de la función de las proteínas es esencial para tener una visión completa del proceso genético.

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes de las células. Como producto final de los genes, desempeñan múltiples funciones. Por ejemplo, los pigmentos respiratorios **hemoglobina** y **mioglobina** se unen al oxígeno. La hemoglobina transporta el oxígeno, que es esencial para el metabolismo celular. El **colágeno** y la **queratina** son dos proteínas estructurales asociadas a la piel, al tejido conjuntivo y al pelo de los organismos. La **actina** y la **miosina** son dos proteínas contráctiles, muy abundantes en el tejido muscular. Otros ejemplos son las **inmunoglobulinas**, que actúan a nivel del sistema inmunitario de los vertebrados; las **proteínas de transporte**, implicadas en el movimiento de moléculas por las membranas; algunas **hormonas** y sus **receptores**, que regulan diversos tipos de actividades químicas; y las **histonas**, que se unen al DNA en los organismos eucarióticos.

El grupo más grande de proteínas con una función relacionada son las **enzimas**. Como nos hemos estado refiriendo a ellas a lo largo de todo este capítulo, puede ser de utilidad hacer una descripción más detallada de su función biológica. Estas moléculas están especializadas en catalizar las reacciones químicas en las células vivas. Las enzimas incrementan la velocidad a la que una reacción química alcanza el equilibrio, sin alterar el punto final de dicho equilibrio. Sus propiedades catalíticas extraordinariamente específicas determinan la capacidad metabólica de cualquier tipo celular. A lo largo de todo el texto se describen las funciones específicas de muchas enzimas implicadas en los procesos genéticos y celulares de las células.

La **catálisis biológica** es un proceso mediante el que se disminuye la **energía de activación** de una reacción dada (Figura 14.21). La energía de activación es el incremento del estado de energía cinética que las moléculas deben alcanzar antes de reaccionar entre ellas. Si bien este estado puede alcanzarse incrementado la temperatura, las enzimas permiten que las reacciones biológicas se produzcan a una temperatura fisiológica más baja. Así pues, las enzimas hacen posible la vida como la conocemos.

Las propiedades catalíticas y la especificidad de una enzima están determinadas por la configuración química del **sitio activo** de la molécula. Este sitió está asociado a una hendidura, a una rendija o a un hoyo de la superficie de la enzima, que une a los reactivos, o substratos, facilitando su interacción. Las reacciones catalizadas enzimáticamente controlan las actividades metabólicas de la célula. Toda reacción es **catabólica** o **anabólica**. El catabolismo es la degradación de moléculas grandes en otras más pequeñas y más simples, con liberación de energía. El anabolismo es la fase sintética del metabolismo, que pro-

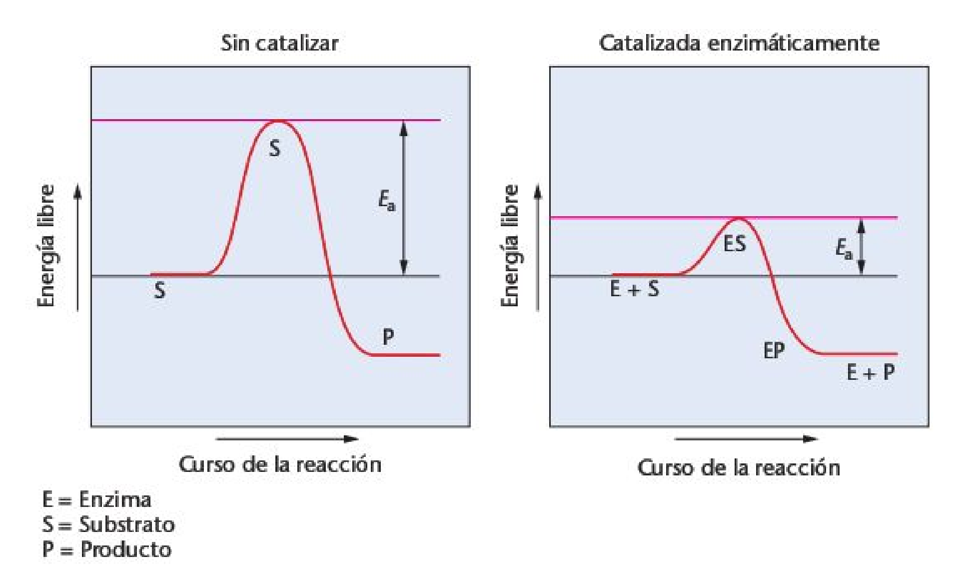


FIGURA 14.21 Requisitos energéticos de una reacción química no catalizada *versus* una reacción química catalizada enzimáticamente. La energía de activación (E_a) necesaria para iniciar la reacción es substancialmente más baja como consecuencia de la catálisis.

porciona los diversos componentes que forman los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos.

14.11 Las proteínas están constituidas por uno o más dominios funcionales

Terminaremos este capítulo discutiendo brevemente el hallazgo de que regiones formadas por secuencias aminoacídicas específicas están asociadas a funciones específicas en las proteínas. Estas secuencias, formadas generalmente por 50 a 300 aminoácidos, constituyen los denominados **dominios proteicos**, y están representados por porciones modulares de la proteína que se pliegan independientemente del resto de la molécula en una conformación estable específica. Los diferentes dominios realizan funciones catalíticas distintas. Algunas proteínas contienen un solo dominio, mientras otras contienen dos o más dominios.

La relevancia de los dominios subyace en la estructura terciaria de la proteína. Cada una de estas unidades modulares puede ser una mezcla de estructuras secundarias, incluyendo tanto las hélices α como las hojas plegadas β. La conformación específica asumida en un único dominio imparte una función específica a la proteína. Por ejemplo, un dominio puede servir de sitio catalítico de una enzima, o le puede dar la capacidad de unirse a un ligando específico. De este modo, al estudiar las proteínas, escuchará las expresiones *dominios catalíticos, dominios de unión al DNA*, etc. El resultado es que se puede considerar que una proteína está formada por una serie de módulos estructurales y funcionales. Obviamente, la presencia de múltiples dominios en una única proteína incrementa la versatilidad de cada molécula, y se añade a su complejidad funcional.

El barajado de exones y el origen de los dominios proteicos

En 1977, Walter Gilbert propuso una interesante sugerencia para explicar el origen genético de los dominios proteicos. Gilbert sugirió que las regiones codificantes de aminoácidos de los genes de los organismos superiores pueden estar formadas por colecciones de exones originalmente presentes en genes ancestrales que, durante la evolución, se han ido juntando por recombinación. Refiriéndose a este proceso como **barajado (combinación) de exones**, Gilbert propuso que los exones son modulares, en el sentido de que cada uno podría codificar un único dominio proteico. Al servir de base para la parte útil de la proteína, un único tipo de dominio podría funcionar en diversas proteínas. En la propuesta de Gilbert, muchos exones podrían haberse mezclado y emparejado durante la evolución para formar los genes especiales de los eucariotas.

Varias observaciones apoyan esta hipótesis. La mayoría de los exones son bastante pequeños, con una media de 150 nucleótidos que codifican para unos 50 aminoácidos. Este tamaño es congruente con la producción de muchos dominios funcionales en las proteínas. Segundo, se esperaría que los sucesos de recombinación que conducen al barajado de exones se produjesen dentro de los intrones. Puesto que los intrones pueden acumular mutaciones libremente sin producir ningún daño a los organismos, los sucesos de recombinación tenderían a hacer aún más aleatoria su secuencia nucleotídica. Tras largos períodos evolutivos, tenderían a acumularse diversas secuencias. De hecho, esto es lo que se observa. Los intrones abarcan de 50 a 20.000 bases, y sus secuencias de bases son bastante aleatorias.

Desde 1977, se ha dirigido un gran esfuerzo de investigación hacia el análisis de la estructura génica. En 1985 se pre-

sentaron pruebas más directas a favor de la propuesta de Gilbert de los módulos exónicos. Por ejemplo, se ha aislado y secuenciado el gen humano que codifica el receptor de membrana para lipoproteínas de baja densidad (LDL). La proteína del receptor de LDL es esencial para el transporte del colesterol plasmático al interior de las células. Esta proteína media la endocitosis y se espera que tenga numerosos dominios funcionales. Estos dominios incluyen la capacidad de la proteína de unir específicamente substratos LDL y de interaccionar con otras proteínas a diferentes niveles de la membrana durante el transporte de estas moléculas. Además, esta molécula receptora se modifica postranscripcionalmente por la adición de un carbohidrato. Por lo tanto, debe haber un dominio al que se una este carbohidrato. Con estas restricciones funcionales, podría predecirse que el polipéptido receptor de LDL debe contener diversos dominios distintos.

El análisis detallado del gen que codifica esta proteína apoya el concepto de los módulos exónicos y su barajado durante la evolución. Este gen es bastante grande, 45.000 nucleótidos, y contiene 18 exones, que representan un poco menos de 2600 nucleótidos. Estos exones se relacionan con dominios funcionales de la proteína y parecen haberse reclutado de otros genes durante la evolución.

La Figura 14.22 esquematiza estas relaciones. El primer exón codifica una secuencia señal que se elimina de la proteína antes de que el receptor de LDL forme parte de la membrana. Los cinco exones siguientes representan el dominio que especifica el sitio de unión al colesterol. Este dominio está formado por una secuencia de 40 aminoácidos repetida siete veces. El siguiente dominio consiste en una secuencia de 400 aminoácidos que tienen una sorprendente homología con el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *epidermal growth factor*) de ratón, una hormona peptídica. Está región está codificada por ocho exones y contiene tres secuencias repetidas de 40 aminoácidos. Una secuencia similar se encuentra otros muchos polipéptidos, entre los que se incluyen tres proteínas de coagulación sanguíneas. El 15º exón especifica el dominio para la adición postranscripcional del carbohidrato, mientras que los 2 exones restantes especifican las regiones de la proteína que se integran en la membrana, anclando el receptor a sitios específicos de la superficie celular denominados *hoyos revestidos*.

Estas observaciones sobre los exones del receptor de LDL dicen bastante a favor de la teoría del barajado de exones durante la evolución. Ciertamente, no hay desacuerdo en el concepto de los dominios proteicos responsables de interacciones moleculares específicas.

Lo que sí es controvertido y sugestivo en la teoría del barajado de exones es la pregunta de cuando aparecieron los intrones por primera vez en el escenario evolutivo. En 1978, W. Ford Doolittle propuso que estas secuencias intercaladas formaban parte del genoma de los ancestros más primitivos de los eucariotas actuales. Apoyando esta idea, del «intrón inicial», Gilbert ha argumentado que si se encuentran semejanzas intrónicas entre genes compartidos por eucariotas no relacionados (como la especie humana, pollo, y maíz), éstos deberían también haber estado presentes en los genomas de los ancestros primitivos.

Si la propuesta de Doolittle es correcta, ¿por qué la mayoría de procariotas no tienen intrones y éstos son muy poco frecuentes en levadura? Gilbert argumenta que estuvieron presentes en un momento de la evolución, pero que se perdieron al evolucionar el genoma de estos organismos primitivos. Esto sucedió como resultado de una fuerte presión selectiva para racionalizar sus cromosomas con el fin de minimizar los gastos de energía durante la replicación y la expresión génica. Además, esta racionalización condujo a una producción de mRNA más libre de errores. Sin embargo, los que apoyan la corriente científica que defiende el «intrón tardío», como Jeffrey Palmer, argumentan que los intrones aparecieron mucho más tarde durante la evolución, formando parte de un solo grupo de eucariotas, que son ancestros de los miembros actuales de este grupo, pero no de los procariotas.

La llegada de la secuenciación genómica a gran escala ha servido para aumentar esta controversia. Actualmente tenemos la capacidad de descifrar la secuencia nucleotídica completa de todo el DNA de un organismo concreto. Comparando las secuencias codificantes y no codificantes de especies evolutivamente alejadas, los genéticos esperan obtener nuevas ideas de cómo han evolucionado estas secuencias. Actualmente, no se ha encontrado ninguna prueba indiscutible que apoye la teoría del «intrón inicial» o la teoría del «intrón tardío», y esta cuestión continua siendo difícil de resolver.

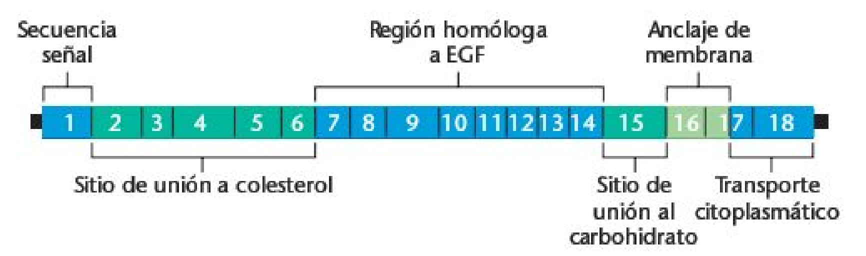


FIGURA 14.22 Comparación de los 18 exones que forman el gen que codifica para la proteína del receptor de LDL. Los exones se organizan en cinco dominios funcionales y una secuencia señal.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

La enfermedad de las vacas locas: la historia de los priones

En marzo de 1996, el gobierno británico anunció que una nueva enfermedad que afecta al cerebro había matado a 10 jóvenes británicos, y que las víctimas habían cogido la enfermedad al comer carne de vaca afectada. La encefalopatía espongiforme bovina (BSE, del inglés *bovine spongiform encephalopathy*), conocida popularmente como «enfermedad de las vacas locas», destruye lentamente las células del cerebro y es siempre mortal. Estudios recientes confirman que la BSE y su correspondiente humana, una variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD, del inglés *new variant Creutzfeldt-Jakob disease*), son tan parecidas a nivel patológico y molecular que con toda probabilidad son la misma enfermedad. La enfermedad de las vacas locas provocó agitación política en Europa, una prohibición mundial de la carne de vaca británica y casi hizo colapsar la industria bovina británica, de 8.900 millones de dólares. La Unión Europea pidió el sacrificio y la incineración de 4,7 millones de vacas británicas, una campaña que al gobierno le costó 12.000 millones de dólares en compensaciones a los granjeros, en importación de leche y en la compra de existencia de nuevos rebaños. La mayoría de países europeos, así como de Oriente Medio, Japón y Canadá han descubierto la presencia de BSE al menos en una vaca. Si bien la mayor parte de casos de nvCJD se han producido en la Gran Bretaña, también se han detectado casos en Francia, Italia, Irlanda, América del sur, Canadá y los Estados Unidos. Hasta la actualidad han muerto más de 125 personas afectadas de nvCJD, y los epidemiólogos estiman que durante las dos próximas décadas aparecerán muchos casos nuevos.

Tanto la BSE como la nvCJD y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés *Creutzfeldt-Jakob disease*) pertenecen a un grupo de enfermedades neurológicas conocido como encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, del inglés *transmissible spongiform encephalopathies*), que afecta a los animales y a los humanos. En este grupo de enfermedades, el cerebro afectado adquiere progresivamente el aspecto de una esponja (de ahí el nombre de espongiforme), y está lleno de depósitos de proteína. Las víctimas de la enfermedad pierden las funciones motoras, presentan locura y al final mueren. La diferencia sintomática entre la CJD y la nvCJD radica en que las víctimas de esta última presentan síntomas sicológicos como depresión o ansiedad antes de desarrollar síntomas neurológicos como temblores o parálisis. Además, generalmente los pacientes de nvCJD son jóvenes (entre 16 y 40 años), mientras que la CJD acostumbra a afectar a personas de más de 55 años. Cada año se produce en todo el mundo un caso aleatorio de CJD por cada millón de habitantes, pero esta enfermedad también puede heredarse de forma autosómica dominante.

La CJD puede transmitirse por un trasplante de córnea o de tejido nervioso, o por la inyección de hormona de crecimiento procedente de glándulas pituitarias humanas. El kuru, una enfermedad parecida a CJD que afecta a los Fore de Nueva Guinea, se transmite de persona a persona por canibalismo ritual. En animales, las encefalopatías espongiformes transmisibles incluyen la tembladera (ovejas y cabras), la enfermedad de la defecación crónica (ciervos) y la BSE. Como el kuru, la BSE se transmite de animal a animal por la ingestión de restos de animales infectados, especialmente de tejido neural. La epidemia de BSE en la Gran Bretaña se produjo porque las vacas y las ovejas enfermas se procesaban para servir suplemento proteico para alimentar a las terneras. En 1998, el gobierno británico prohibió el uso de vacas y ovejas para alimentar otras vacas y ovejas, y la epidemia ha remitido. Actualmente la Unión Europea ha prohibido el uso de piensos que contengan productos animales para todas las cabañas. En cambio, en los Estados Unidos y en Canadá todavía se permite que los animales no rumiantes consuman comida que contenga rumiantes, y que los rumiantes consuman comida que contenga no rumiantes, así como también determinados productos derivados de los rumiantes, como sangre, gelatina y grasa. Sin embargo estas regulaciones pueden cambiar como consecuencia del descubrimiento el año 2003 de un caso de BSE en Canadá. Además, estudios recientes sugieren que la BSE podría transmitirse por la sangre y grasa refinada.

Durante muchos años, el análisis de las encefalopatías espongiformes desafió el esfuerzo de los científicos. Es difícil investigar estas enfermedades por distintos motivos. En primer lugar, es preciso infectar material de cerebro afectado al cerebro de animales de experimentación; la enfermedad tarda meses e incluso años en desarrollarse. Además, aparentemente el agente infeccioso no es ni una bacteria ni un virus, y los animales infectados no desarrollan anticuerpos contra estos misteriosos agentes.

No hay ningún tratamiento para la enfermedad, y la única manera de hacer un diagnóstico preciso es examinar el tejido cerebral postmortem. El material infeccioso no se altera con radiaciones ni con nucleasas que dañan los ácidos nucleicos. Sin embargo, algunos agentes que hidrolizan o modifican proteínas sí lo destruyen. A principios de la década de 1980, un científico americano, Stanley Prusiner, purificó el agente infeccioso y concluyo que estaba formado sólo por proteína. Propuso que la tembladera se transmite mediante una partícula proteica a la que denominó *prión*. Muchos científicos rechazaron esta hipótesis, ya que la idea de un agente infeccioso carente de DNA o de RNA era herética. Sin embargo, Prusiner y otros investigadores presentaron pruebas que apoyaban la hipótesis del prión, y se ha aceptado la noción de que esta enfermedad puede transmitirse por una partícula infecciosa que carece de material genético.

Si los priones sólo están formados por proteína, ¿cómo causan la enfermedad? La respuesta puede ser tan extraña como la propia enfermedad. La proteína que constituye un prión (PrP) es una versión de una proteína normal sintetizada en las neuronas y que se encuentra en el cerebro de todos los animales adultos. La diferencia entre la PrP normal y la del prión subyace en la estructura secundaria de las proteínas. La PrP normal

no infecciosa se pliega en hélices α, mientras que la del prión infecciosa se pliega en una hoja plegada β. Cuando una molécula PrP normal entra en contacto con una molécula PrP de un prión, la proteína normal se despliega y se vuelve a plegar adquiriendo la conformación anormal. Una vez una molécula PrP normal se ha transformado en una PrP anormal, transmite su conformación letal a las moléculas PrP normales vecinas, y el proceso se convierte en una reacción en cadena. La PrP normal es una proteína soluble que es fácilmente destruida mediante calor o por enzimas que digieren proteínas. Sin embargo, la PrP anormal infecciosa es insoluble en detergentes, es resistente tanto al calor como a digestiones enzimáticas, y es casi indestructible. Por eso las encefalopatías espongiformes pueden considerarse enfermedades de la estructura secundaria de las proteínas.

Hay muchas cuestiones urgentes que deben abordarse. ¿Cuán extendida está la contaminación de BSE en el suministro mundial de alimentos? ¿Cuántos humanos están afectados de nvCJD pero no presentan los síntomas? ¿Los humanos o los animales pueden ser portadores asintomáticos de enfermedades causadas por priones? ¿Los priones pueden existir en otras partes del cuerpo aparte del cerebro y la médula espinal, y, si es así, puede transmitirse la nvCJD por transfusiones sanguíneas, de madres a fetos o por material quirúrgico esterilizado? ¿Se pueden desarrollar ensayos diagnósticos y terapias para la BSE y la nvCJD? ¿Nos acercamos al final de la historia de la BSE, o esto es solo el comienzo?

Referencias

Balter, M. 2000. Tracking the human fallout from «mad cow disease». *Science* 289:1452-54.

Belay, E.D. 1999. Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:283-314.

Spencer, C.A. 2004. *Mad Cows and Cannibals: A Guide to the Transmissible Spongiform Encephalopathies.* Upper Saddle River: Pearson/Prentice-Hall.

Páginas Web

Recopilación Online de noticias sobre la enfermedad de las vacas locas.

http://organicconsumers.org/madcow.htm

Página oficial de la enfermedad de las vacas locas (recopilación de noticias).

http://www.mad-cow.org

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. La traducción es el proceso celular de síntesis de cadenas polipeptídicas, que se produce bajo la dirección del mRNA y en asociación con los ribosomas. En última instancia este proceso convierte la información almacenada en el código genético del DNA que forma un gen en la correspondiente secuencia aminoacídica que forma un polipéptido.
2. La traducción es un proceso complejo que precisa energía y en el que participan moléculas de tRNA cargadas y numerosos factores proteicos. El RNA transferente (tRNA) sirve de molécula adaptadora entre un triplete de mRNA y el aminoácido adecuado.
3. El proceso de traducción, como el de transcripción, puede subdividirse en los estadios de iniciación, elongación y terminación. Este proceso se basa en las afinidades de emparejamiento de bases entre nucleótidos complementarios, y es más complejo en eucariotas que en procariotas.
4. El estudio de las enfermedades metabólicas hereditarias en humanos realizado por Garrot a principios del siglo XX proporcionó la primera idea de que las proteínas son el producto final de los genes. Los errores congénitos del metabolismo que conducen al más importante de los estudios de Garrod realizados a principios del siglo XX sobre las la cistinuria, el albinismo y la alcaptonuria fueron fundamentales pare estos estudios.
5. La investigación de los requisitos nutricionales de *Neurospora*, realizada por Beadle y sus colaboradores, demostró que las mutaciones causan la pérdida de actividad enzimática. Su trabajo condujo al concepto de la hipótesis de un gen:una enzima.
6. Posteriormente se reescribió la hipótesis de un gen:una enzima. Las investigaciones de la hemoglobina en pacientes con anemia falciforme, realizadas por Pauling e Ingram, condujeron a estos científicos a descubrir que un gen dirige la síntesis de sólo una cadena polipeptídica.
7. Investigaciones meticulosas han revelado la existencia de varias clases importantes de moléculas de hemoglobina humana, que se encuentran en el embrión, en el feto y en el adulto. Genes específicos controlan cada una de las cadenas polipeptídicas que forman estas distintas moléculas de hemoglobina.
8. Los experimentos de mutaciones de la triptófano sintetasa de *E. coli* confirmaron la propuesta de que la secuencia nucleotídica del gen especifica la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de manera colinear.
9. Las proteínas, el producto final de los genes, muestran cuatro niveles de organización estructural que proporcionan la base química para su conformación tridimensional, que es la base de la función de la molécula.
10. De la miríada de funciones que realizan las proteínas, la función más influyente es asumida por las enzimas. Estos catalizadores celulares altamente específicos desempeñan una función central en la producción de todas las clases de moléculas de los sistemas biológicos.
11. Las proteínas están formadas por uno o más dominios funcionales, compartidos por muchas moléculas diferentes. El origen de estos dominios puede ser el resultado del barajado de exones durante la evolución.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Utilizando cuatro cepas mutantes de *Neurospora* y los compuestos A, B, C y D relacionados se obtuvieron las siguientes respuestas de crecimiento. Ninguno de estos mutantes puede crecer en medio mínimo. Exponga todas las conclusiones posibles.

	Crecimiento en función del producto			
Mutación	**C**	**D**	**B**	**A**
1	−	−	−	−
2	−	+	+	+
3	−	−	+	+
4	−	−	+	−

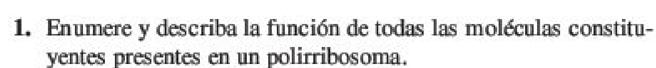
Solución: Primero, no se puede concluir nada de la mutación 1, excepto que le falta algún factor de crecimiento esencial, que quizá ni siquiera esté relacionado con la ruta metabólica representada por las mutaciones 2-4; tampoco se puede concluir nada sobre la sustancia C. Si está implicada en la ruta, debe ser un producto sintetizado antes que A, B y D. Ahora debemos analizar estos tres componentes y el control de su síntesis por las enzimas 2, 3 y 4. Ya que el producto B permite el crecimiento en los tres casos, podría considerarse como el «producto final». Éste supera el bloqueo en los tres casos. Utilizando un razonamiento similar, el producto A es anterior al B en la ruta ya que permite que se supere la ruta en dos de los tres pasos. El producto D precede al B, obteniéndose la siguiente ruta:

$$C(?) \rightarrow D \rightarrow A \rightarrow B$$

Determinemos ahora qué mutación controla cada paso. Como los productos D, B y A mitigan los efectos de la mutación 2, ésta debe controlar un paso anterior a estos tres productos, dirigiendo quizá la conversión a D, aunque no podemos estar seguros de ello. B y A mitigan los efectos de la mutación 3, de manera que su efecto debe preceder a ambos productos en la ruta. Así, asignaremos que controla la conversión de D en A. De la misma manera, podemos asignar que la mutación 4 convierte A en B, obteniéndose la siguiente ruta:

$$C(?) \xrightarrow{2(?)} D \xrightarrow{3} A \xrightarrow{4} B$$

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN



1. Enumere y describa la función de todas las moléculas constituyentes presentes en un polirribosoma.
2. Compare las funciones del tRNA y del mRNA durante la traducción, y enumere todas las enzimas que participan en los procesos de transcripción y traducción.
3. Francis Crick propuso «la hipótesis del adaptador» para la función del tRNA. ¿Por qué eligió esta descripción?
4. Durante la traducción, ¿qué molécula lleva el codón? ¿Y el anticodón?
5. La cadena α de la hemoglobina eucariótica está formada por 141 aminoácidos. ¿Cuál será el número mínimo de nucleótidos de un mRNA que codifique esta cadena polipeptídica? Considerando que en el mRNA cada nucleótido tiene una longitud de 0,34 nm, ¿cuántos tripletes puede haber al mismo tiempo en un ribosoma que tiene 20 nm de diámetro?
6. Resuma los pasos de la carga del tRNA con el aminoácido correcto.
7. Para llevar a cabo su función, cada RNA transferente precisa al menos cuatro sitios de reconocimiento específicos inherentes a su estructura terciaria. ¿Cuáles son?
8. Discuta las dificultades que puede haber al diseñar una dieta para aliviar los síntomas de la fenilcetonuria.
9. Los individuos afectados de fenilcetonuria no pueden convertir la fenilalanina en tirosina. ¿Por qué estos individuos no muestran deficiencia en tirosina?
10. Los individuos afectados de fenilcetonuria tienen, a menudo, menos pigmento que los individuos normales. ¿Puede sugerir un motivo de por qué es así?
11. Se sabe que la síntesis de los pigmentos de las flores está controlada por rutas enzimáticas biosintéticas. En los cruzamientos que se muestran a continuación, postule la función de los genes mutantes y de sus productos en los fenotipos observados.

(a)	P_1: cepa blanca A × cepa blanca B F_1: todas púrpuras F_2: 9/16 púrpuras : 7/16 blancas
(b)	P_1: blanca × rosa F_1: todas púrpuras F_2: 9/16 púrpuras : 3/16 rosas : 4/16 blancas

12. Un grupo de mutaciones de la bacteria *Salmonella typhimurium* precisa triptófano o alguna molécula relacionada para crecer. Con los datos que se muestran a continuación, sugiera una ruta biosintética del triptófano.

Suplemento para el crecimiento					
Mutación	Medio mínimo	Ácido antra-nílico	Fosfato de indol glicerol	Indol	Triptó-fano
trp-8	–	+	+	+	+
trp-2	–	–	+	+	+
trp-3	–	–	–	+	+
trp-1	–	–	–	–	+

13. El análisis de los mutantes bioquímicos en organismos como *Neurospora* ha demostrado que algunas rutas están ramificada. Los datos que se muestran a continuación demuestran la naturaleza ramificada de la ruta de síntesis de la tiamina.

Suplemento para el crecimiento				
Mutación	Medio mínimo	Pirimidina	Tiazol	Tiamina
thi-1	–	–	+	+
thi-2	–	+	–	+
thi-3	–	–	–	+

¿Por qué estos datos no apoyan una ruta lineal? ¿Puede postular una ruta para la síntesis de la tiamina en *Neurospora*?

14. Explique por qué hoy en día no se considera suficientemente preciso el concepto de un gen:una enzima.

15. ¿Por qué una alteración de la movilidad electroforética puede interpretarse como un cambio en la estructura primaria de la proteína?

16. Compare las cadenas polipeptídicas que forman cada una de las moléculas de la hemoglobina humana.

17. Utilizando como base la anemia falciforme, describa qué se entiende por una enfermedad molecular o genética. ¿Qué semejanzas y diferencias hay entre este tipo de enfermedad y una enfermedad causada por un microorganismo invasor?

18. Compare las contribuciones de Pauling y de Ingram al conocimiento de la base genética de la anemia falciforme.

19. Se compara la hemoglobina de dos individuos mediante electroforesis y mediante la huella molecular. La electroforesis revela que no hay ninguna diferencia en su migración, pero la huella molecular muestra una diferencia en un aminoácido. ¿Cómo es posible?

20. Describa que significa colinearidad. ¿Qué importancia tiene el concepto de colinearidad en el estudio de la genética?

21. Determinadas mutaciones denominadas *ámbar* provocan, en bacterias y en virus, la terminación prematura de las cadenas polipeptídicas durante la traducción. Se han detectado muchas mutaciones *ámbar* en puntos diferentes del gen que codifica la proteína de la cápside del fago T4. ¿Cómo se podría utilizar este sistema para demostrar el concepto de colinearidad?

22. Defina y compare los cuatro niveles de organización de las proteínas.

23. Enumere tantas funciones proteicas diferentes como pueda. Dé un ejemplo de cada categoría siempre que le sea posible.

24. ¿Cómo funciona una enzima? ¿Por qué las enzimas son esenciales para la vida de los organismos de la Tierra?

20. Explique el ensamblaje de la fibra de colágeno y las enfermedades «del colágeno» que se producen como consecuencia de mutaciones que afectan al ensamblaje y/o a la fibra de colágeno madura.

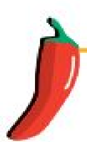
25. ¿Por qué el trabajo de Fiers con el fago MS2, tratado en el Capítulo 13, constituye una prueba más directa del concepto de colinearidad que el trabajo de Yanofsky con el locus *trpA* de *E. coli* (tratado en este capítulo)? Explíquelo.

26. A continuación se muestran diversas sustituciones aminoacídicas en las cadenas α y β de la hemoglobina humana.

Tipo de Hb	Aminoácido normal	Aminoácido substituto
Hb Toronto	ala	asp (α-5)
HbJ Oxford	gly	asp (α-15)
Hb Méjico	gln	glu (α-54)
Hb Bethesda	tyr	his (β-145)
Hb Sidney	val	ala (β-67)
HbM Saskatoon	his	tyr (β-63)

Utilizando la tabla del código genético (Figura 13.7), determine cuántas de ellas pueden producirse como consecuencia del cambio de un sólo nucleótido.

27. La detección precoz y el seguimiento de un régimen dietético estricto ha aliviado gran parte del retraso mental que antes se producía en las personas afectadas de fenilcetonuria (PKU, del inglés *phenylketonuria*). Actualmente, a menudo los individuos afectados llevan una vida normal y pueden tener familia. Por diversos motivos, estas personas relajan su dieta al hacerse mayores. Prediga el efecto de esta situación en los recién nacidos de madres que descuidan su dieta.



Problemas extra-picantes

28. En 1962, F. Chapeville y sus colaboradores hicieron público un experimento en el que aislaron ^{14}C-cisteinil-tRNA^{cys} radiactivo (tRNA^{cys} cargado + cisteína). Entonces eliminaron el grupo sulfuro de la cisteína, generando alanil-tRNA^{cys} (tRNA^{cys} cargado + alanina). Cuando se añadió el alanil-tRNA^{cys} a un mRNA sintético que codificaba cisteína, pero no alanina, se sintetizó una cadena polipeptídica que contenía alanina. ¿Qué se puede concluir de este experimento? (Chapeville, *et al.* 1962. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [USA] 48:1086-93.)

29. Se sabe que tres genes que segregan independientemente controlan la siguiente ruta bioquímica, que proporciona la base para el color de las flores en una planta hipotética:

$$\text{Sin color} \xrightarrow{A-} \text{amarilla} \xrightarrow{B-} \text{verde} \xrightarrow{C-} \text{moteada}$$

Se conocen mutaciones homocigóticas recesivas que interrumpen cada uno de los pasos. Determine el fenotipo de F_1 y de F_2 resultante de los siguientes cruzamientos entre plantas P_1 de líneas puras.

(a) moteada (*AABBCC*)	×	amarilla (*AabbCC*)	
(b) amarilla (*AabbCC*)	×	verde	(*AABBcc*)
(c) sin color (*aaBBCC*)	×	verde	(*AABBcc*)

30. ¿Cómo cambiaría el resultado del cruzamiento (a) del Problema 29 si los genes A y B estuviesen ligados y no existiese entrecruzamiento entre ellos? ¿Cómo cambiaría el cruzamiento (a) si los genes A y B estuviesen ligados a una distancia de 20 unidades de mapa?

31. La HbS es el resultado del cambio del aminoácido ácido glutámico por valina en la posición número 6 de la cadena B de la hemoglobina humana. HbC es el resultado de un cambio en la misma posición, pero es la lisina la que reemplaza al ácido glutámico. Vaya a la tabla del código genético (Figura 13.7) y determine si el cambio de un solo nucleótido puede justificar estas mutaciones. Después mire la Figura 14.16 y examine los grupos R de los aminoácidos ácido glutámico, valina y lisina. Describa las diferencias químicas entre estos tres aminoácidos. Prediga cómo pueden alterar estos cambios la estructura de la molécula que conduce a la función alterada de la hemoglobina. La HbS produce anemia falciforme y resistencia a la malaria, mientras que en las personas que tienen HbA el parásito *Plasmodium falciparum* les invade sus glóbulos rojos y les provoca la enfermedad. Prediga si es probable que las personas con HbC sean anémicas y si serían resistentes a la malaria.

32. La mayoría de los lirios tienen flores de color naranja y pertenecen a una línea pura. Una estudiante de genética descubrió variantes amarillas y rojas pertenecientes a líneas puras, y procedió a cruzar las tres cepas. Como conocía los principios de la genética de la transmisión, supuso que había dos pares de genes implicados. De acuerdo con esto, propuso que estos genes justifican los diversos colores que se muestran a continuación:

P_1	F_1	F_2
(1) naranja × rojo	todos naranja	3/4 naranja 1/4 rojo
(2) naranja × amarillo	todos naranja	3/4 naranja 1/4 amarillo
(3) rojo × amarillo	todos naranja	9/16 naranja 4/16 amarillo 3/16 rojo

(a) ¿Qué resultados de los cruzamientos le sugirieron que había dos pares de genes implicados?

(b) Suponiendo que estuviese en lo cierto y utilizando los símbolos *y* (amarillo) y *r* (rojo) para los genes mutantes, proponga qué genotipos dieron lugar a qué fenotipos.

(c) La estudiante ideó diversas rutas bioquímicas posibles para la producción de estos pigmentos, así como qué gen controla enzimáticamente cada uno de los pasos. Estas rutas se enumeran a continuación.

I. precursor blanco I $\xrightarrow{\text{gen } y}$ pigmento rojo
precursor blanco II $\xrightarrow{\text{gen } r}$ pigmento amarillo

II. precursor blanco I $\xrightarrow{\text{gen } r}$ pigmento rojo
precursor blanco II $\xrightarrow{\text{gen } y}$ pigmento amarillo

III. precursor blanco ⟶ rojo $\xrightarrow{\text{gen } y}$ amarillo $\xrightarrow{\text{gen } r}$ naranja

IV. precursor blanco ⟶ rojo $\xrightarrow{\text{gen } r}$ amarillo $\xrightarrow{\text{gen } y}$ naranja

V. precursor blanco ⟶ amarillo $\xrightarrow{\text{gen } y}$ rojo $\xrightarrow{\text{gen } r}$ naranja

VI. precursor blanco ⟶ amarillo $\xrightarrow{\text{gen } r}$ rojo $\xrightarrow{\text{gen } y}$ naranja

¿Cuáles de éstas (una o más de una) son congruentes con lo propuesto en el apartado (b)? ¿Cuál se basa en los datos originales? Suponga que el pigmento naranja es el resultado de la mezcla de los pigmentos amarillo y rojo. Argumente su respuesta.

33. En el bosque lluvioso tropical de una región inexplorada de América del Sur, se descubrió una especie nueva de plantas que presentaba varias líneas puras con flores de color rosa, rosado, naranja y púrpura. Un genético de plantas muy astuto hizo un único cruzamiento, y lo examinó hasta la F_2, como se muestra a continuación.

P_1:	púrpura × rosa
F_1:	todas púrpuras
F_2:	27/64 púrpuras 16/64 rosas 12/64 rosadas 9/64 naranjas

Basándose solamente en estos datos, pudo proponer un modelo de herencia de los pigmentos florales y una ruta bioquímica de su síntesis.

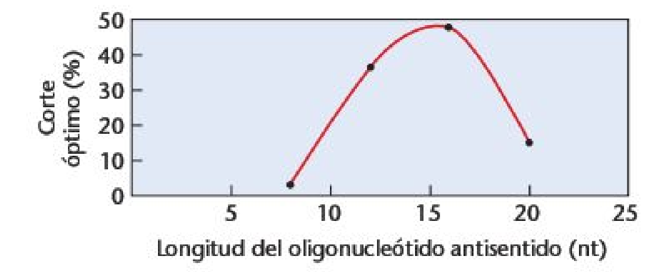
Analice cuidadosamente estos datos. Establezca una hipótesis que explique el modelo de herencia. Después proponga una ruta bioquímica congruente con su hipótesis. ¿Cómo puede demostrar su hipótesis haciendo otros cruzamientos?

34. La aparición de cepas de *Enterococci* resistentes a antibióticos y la transferencia de los genes de resistencia a otras bacterias patógenas ha resaltado la necesidad de una nueva generación de antibióticos para combatir las infecciones graves. Para comprender la gama de sitios de acción potenciales para los antibióticos existentes, esboce los componentes de la maquinaria de traducción (p.e., vea el paso 3 de la Figura 14.6) y utilice los números para indicar la localización específica para la acción de los antibióticos que se muestran en la siguiente tabla.

Antibiótico	Acción
1. Estreptomicina	Se une a la subunidad 30*S* del ribosoma
2. Cloranfenicol	Inhibe la peptidiltransferasa del ribosoma 70*S*
3. Tetraciclina	Inhibe la unión del tRNA cargado al ribosoma
4. Eritromicina	Se une a partículas 50*S* libres y evita la formación del ribosoma 70*S*
5. Kasugamicina	Inhibe la unión del $tRNA^{fmet}$
6. Triostepton	Evita la translocación inhibiendo el EF-G

35. El desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de bacterias patógenas representa un importante problema de salud. La evernimicina es un nuevo antibiótico potencial, que se ha sido aislado de *Micromonospora carbonaceae*. La evernimicina es un antibiótico oligosacárido que tiene actividad contra una amplia gama de bacterias patógenas gram-positivas. Para determinar el modo de acción de este medicamento, Adrian y sus colaboradores (2000, *Antimicrob. Ag. and Chemo.* 44:3101-06) analizaron mutantes de RNA ribosómico 23*S* que mostraban una sensibilidad menor a la evernimicina. Estos y otros investigadores hallaron dos tipos de mutantes que confieren resistencia: los nucleótidos 2475-2483 del rRNA 23*S*, y la proteína ribosómica L16. Esto sugiere que estos dos componentes ribosómicos están estructuralmente o funcionalmente relacionados. Parece ser que el lazo y el pedúnculo anticodón del tRNA se une al sitio A del ribosoma en las bases 2475-2483 del rRNA. Este hallazgo es congruente con la acción propuesta para L16, que parece estar implicada en atraer el pedúnculo aminoacil del tRNA hacia el ribosoma en el sitio A. Utilizando conjuntamente el boceto de la maquinaria de traducción del Problema 34 y esta información, diga dónde es probable que ocurra la acción antibacteriana propuesta para la evernimicina.

36. El flujo de información genética del DNA a las proteínas está mediado por el RNA mensajero. Si se introducen cadenas cortas de DNA que sean complementarias a los mRNA (denominadas oligonucleótidos antisentido), se pueden producir puentes de hidrógeno, lo que «marca» el híbrido DNA/RNA para que la ribonucleasa H degrade el RNA. Lloyd y sus colaboradores (2001, Nuc. Acid. Res. 29: 3664-73) compararon el efecto de la longitud de los oligonucleótidos antisentido sobre la degradación mediada por ribonucleasa H del mRNA del factor de necrosis tumoral (*TNFa*). *TNFa* presneta actividad antitumoral y proinflamatoria. La gráfica que se muestra a continuación indica la eficiencia de oligonucleótidos antisentido de distinta longitud para provocar la degradación mediada por ribonucleasa H. (a) Describa cómo los oligonucleótidos antisentido interrumpen el flujo de información genética en la célula. (b) ¿Qué conclusión general se hace evidente en la gráfica? (c) ¿Qué factores es probable que influyan en la eficacia del antisentido in vivo, además de la longitud del oligonucleótido?



LECTURAS SELECCIONADAS

Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-30.

Bartholome, K. 1979. Genetics and biochemistry of phenylketonuria—Present state. *Hum. Genet.* 51:241-45.

Beadle, G.W., and Tatum, E.L. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 27:499-506.

Beet, E.A. 1949. The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. *Ann. Eugenics* 14:279-84.

Brenner, S. 1955. Tryptophan biosynthesis in *Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41:862-63.

Doolittle, R.F. 1985. Proteins. *Sci. Am.* (Oct.) 253:88-99.

Frank, J. 1998. How the ribosome works. *Amer. Scient.* 86:428-39.

Garrod, A.E. 1902. The incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality. *Lancet* 2:1616-20.

______. 1909. *Inborn errors of metabolism.* London: Oxford University Press. (Reprinted 1963, Oxford University Press, London.)

Garrod, S.C. 1989. Family influences on A.E. Garrod's thinking. *J. Inher. Metab. Dis.* 12:2-8.

Ingram, V.M. 1957. Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle-cell hemoglobin. *Nature* 180:326-28.

Koshland, D.E. 1973. Protein shape and control. *Sci. Am.* (Oct.) 229:52-64.

Lake, J.A. 1981. The ribosome. *Sci. Am.* (Aug.) 245:84-97.

Maniatis, T., et al. 1980. The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu. Rev. Genet.* 14:145-78.

Murayama, M. 1966. Molecular mechanism of red cell sickling. *Science* 153:145-49.

Neel, J.V. 1949. The inheritance of sickle-cell anemia. *Science* 110:64-66.

Nirenberg, M.W., and Leder, P. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145:1399-1407.

Nomura, M. 1984. The control of ribosome synthesis. *Sci. Am.* (Jan.) 250:102-14.

Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J., and Wells, I.C. 1949. Sickle-cell anemia: A molecular disease. *Science* 110:543-48.

Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108:557-72.

Rich, A., and Houkim, S. 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* (Jan.) 238:52-62.

Rich, A., Warner, J.R., and Goodman, H.M. 1963. The structure and function of polyribosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:269-85.

Richards, F.M. 1991. The protein-folding problem. *Sci. Am.* (Jan.) 264:54-63.

Ross, J. 1989. The turnover of mRNA. *Sci. Am.* (Apr.) 260:48-55.

Rould, M.A., et al. 1989. Structure of *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase complexed with $tRNA^{gln}$ and ATP at 2.8 resolution. *Science* 246:1135-42.

Scott-Moncrieff, R. 1936. A biochemical survey of some Mendelian factors for flower colour. *J. Genet.* 32:117-70.

Scriver, C.R., and Clow, C.L. 1980. Phenylketonuria and other phenylalanine hydroxylation mutants in man. *Annu. Rev. Genet.* 14:179-202.

Srb, A.M., and Horowitz, N.H. 1944. The ornithine cycle in *Neurospora* and its genetic control. *J. Biol. Chem.* 154:129-39.

Warner, J., and Rich, A. 1964. The number of soluble RNA molecules on reticulocyte polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51:1134-41.

Wimberly, B.T., et al. 2000. Structure of the 30*S* ribosomal subunit. *Nature* 407:327-33.

Yanofsky, C., Drapeau, G., Guest, J., and Carlton, B. 1967. The complete amino acid sequence of the tryptophan synthetase A protein and its colinear relationship with the genetic map of the *A* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:296-98.

Yusupov, M.M., et.al. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5A resolution. *Science* 292:883-96.

Capítulo Quince

Mutación génica, reparación del DNA y transposición



Eritrocitos mutantes provenientes de un individuo con anemia falciforme.

Conceptos del capítulo

- Las mutaciones son la fuente de variación genética y la base para la selección natural. También son el origen del daño genético que contribuye a la muerte celular, a enfermedades genéticas y al cáncer.
- Las mutaciones tienen una amplia gama de efectos sobre los organismos dependiendo del tipo de cambio nucleotídico y de su localización en el gen y en el genoma.
- Las mutaciones pueden ocurrir de forma espontánea como resultado de procesos biológicos y químicos naturales, y pueden inducirse mediante factores externos, como productos químicos y radiaciones.
- La tasa de mutación espontánea varía entre organismos y entre los genes de un mismo organismo.
- Los organismos tienen diversos mecanismos de reparación del DNA que contrarrestan las mutaciones. Estos mecanismos van de la lectura de pruebas de los errores de replicación a la reparación por escisión de bases y por recombinación homóloga.
- Mutaciones en genes cuyos productos controlan la reparación del DNA conducen a una hipermutabilidad genómica y a enfermedades de reparación del DNA en humanos, como la xeroderma pigmentosum.
- Los elementos transponibles generan mutaciones al entrar y salir de los cromosomas. Inducen mutaciones en las regiones codificantes y en las regiones reguladoras de los genes, y provocan roturas cromosómicas.

La capacidad de las moléculas de DNA de almacenar, replicar, transmitir y descodificar información es la base de la función genética. Pero igualmente importante es la capacidad del DNA de cometer errores. Sin la variación que surge de los cambios en las secuencias de DNA, no habría variabilidad fenotípica, ni adaptación a los cambios ambientales, ni evolución. Las mutaciones génicas son el origen de la mayoría de alelos nuevos, y son el origen de la variación genética entre poblaciones. En el polo opuesto, también son el origen de cambios genéticos que conducen a la muerte celular, a enfermedades genéticas y al cáncer.

Las mutaciones proporcionan la base para el análisis genético. La variabilidad fenotípica resultante permite investigar los genes que controlan las características que se han modificado. En las investigaciones genéticas, las mutaciones sirven de «marcadores» para identificar los genes, de manera que puedan seguirse durante la transmisión de padres a hijos. Sin la variabilidad fenotípica no sería posible realizar análisis genéticos. Por ejemplo, si todas las plantas de guisantes tuviesen el mismo fenotipo, Mendel no hubiera tenido ninguna base para sus experimentos. Determinados organismos se prestan a la inducción de mutaciones, que pueden detectarse y estudiarse con facilidad. Estos organismos modelo incluyen los virus, las bacterias, los hongos, las moscas de la fruta y los ratones. En el Capítulo 21 trataremos extensamente cómo los genéticos realizan los análisis genéticos en estos organismos modelo para diseccionar la función génica.

En el Capítulo 8 examinamos las mutaciones en grandes regiones cromosómicas, las mutaciones cromosómicas. En este capítulo exploraremos primero las mutaciones a nivel de cambios en la secuencia de pares de bases del DNA dentro de genes concretos, las **mutaciones génicas**. También se describirá cómo las células se defienden de las mutaciones usando diversos mecanismos de **reparación del DNA**. Terminaremos este capítulo discutiendo los **elementos transponibles**, denominados a veces «genes saltarines» o **transposones**, que son capaces de alterar la función génica y de transportar información genética dentro de una misma molécula de DNA y entre diferentes moléculas de DNA.

15.1 Las mutaciones se clasifican de diversas maneras

Se puede definir mutación como una alteración de la secuencia de DNA. Cualquier cambio de pares de bases en cualquier parte de la molécula de DNA puede considerarse una mutación. Una mutación puede comprender la substitución de un solo par de bases, la deleción o la inserción de uno o de más pares de bases, o puede constituir una alteración importante de la estructura de un cromosoma.

Las mutaciones pueden producirse dentro de las regiones de un gen que codifican la proteína y en regiones externas a los genes que afectan a su expresión, o en otros sitios del DNA. (Véanse los Capítulos 13, 14, 16 y 17 para la descripción de la expresión génica y de su regulación.) Por eso, las mutaciones pueden acarrear un cambio fenotípico que sea detectable o que no lo sea. El grado en que una mutación cambia las características de un organismo depende del sitio donde se haya producido y del alcance de la alteración del gen.

Las mutaciones pueden producirse en las células somáticas o en las células germinales. Las que se producen en las células germinales son hereditarias y son la base de la diversidad genética y de la evolución, así como también de las enfermedades genéticas. Las que se producen en células somáticas pueden ocasionar muerte celular localizada, una función celular alterada o tumores.

Debido a la gran variedad de tipos y efectos de las mutaciones, los genéticos las clasifican de diversas maneras. Estos esquemas de organización de las mutaciones no son mutuamente excluyentes. En esta sección se resumen algunas de las maneras de clasificar las mutaciones génicas.

Mutaciones espontáneas, inducidas y adaptativas

Todas las mutaciones son espontáneas o inducidas, aunque estas dos categorías tienen un cierto solapamiento. Las **mutaciones espontáneas** son las que se producen de manera natural. No hay ningún agente específico asociado a ellas y se supone, en general, que son debidas a cambios aleatorios de la secuencia nucleotídica de los genes. La mayoría de estas mutaciones están relacionadas a procesos químicos o biológicos normales del organismo que alteran la estructura de las bases nitrogenadas. A menudo la mayoría de las mutaciones espontáneas se producen durante el proceso enzimático de replicación del DNA, idea que trataremos posteriormente en este capítulo. Una vez se produce un error en el código genético, éste puede reflejarse en la composición de aminoácidos de la proteína que codifica. Si el aminoácido alterado se encuentra en una parte esencial de la molécula para su estructura o su actividad bioquímica, puede producirse un cambio fenotípico.

En contraste con estos sucesos espontáneos, las mutaciones que se producen por la influencia de cualquier factor externo se consideran **mutaciones inducidas**. Las mutaciones inducidas pueden ser el resultado de agentes naturales y artificiales. Por ejemplo, la mayoría de los organismos están expuestos a fuentes de energía como las radiaciones cósmicas, las provenientes de minerales y la radiación ultravioleta del Sol, que pueden ser factores que provoquen mutaciones inducidas. La primera demostración de inducción artificial de mutaciones se produjo en 1927, cuando Herman J. Muller publicó que los rayos X pueden provocar mutaciones en *Drosophila*. En 1928, Lewis J. Stadler comunicó que los rayos X tienen el mismo efecto en la cebada. Además de los diversos tipos de radiaciones, se conoce un amplio espectro de agentes químicos tanto naturales como producidos por los humanos que también son mutagénicos, como veremos en este capítulo.

El concepto de **adaptación adaptativa** gira en torno la controvertida idea que un organismo puede «seleccionar» o «dirigir» la naturaleza de una mutación génica para adaptarse a un cambio ambiental concreto. En 1943, Salvador Luria y Max Delbrück presentaron la primera prueba directa que las mutaciones no son adaptativas, sino espontáneas. Este experimento marcó el inicio de los estudios genéticos modernos en bacterias. Su experimento, conocido como la **prueba de la fluctuación de Luria-Delbrück**, es un ejemplo exquisito de trabajo teórico y analítico.

Luria y Delbruck realizaron sus experimentos con el sistema *E. coli*-T1. El bacteriófago T1 es un virus bacteriano que infecta las células de *E. coli*, y lisa la célula infectada. En el Capítulo 6 se describe el bacteriófago T4, que es parecido. Luria y Delbruck cultivaron muchos cultivos líquidos de *E. coli* sensible al fago T1, y añadieron alícuotas de cada cultivo a placas de Petri que contenían medio de agar que contenían bacteriófagos T1. Después de incubarlas, contaron en cada placa el número de colonias de bacterias resistentes al fago que crecían en presencia del bacteriófago. Esta verificación fue sencilla ya que las células mutantes eran las únicas que no se habían lisado, y por lo tanto las únicas que habían sobrevivido para ser contadas.

La lógica experimental que permitía distinguir entre estas dos hipótesis (las mutaciones se producen espontáneamente *versus* las mutaciones ocurren como consecuencia de adaptación) fue la siguiente:

Hipótesis 1. Mutación adaptativa. En este escenario, cada bacteria tiene una probabilidad pequeña, pero constante, de adquirir resistencia como consecuencia del contacto con los fagos de la placa de Petri. En este caso, la bacteria adquiere la resistencia por mutación como consecuencia de su incubación con el bacteriófago. Por lo tanto, el número de células resistentes dependerá solo del número de bacterias y fagos que se han añadido a cada placa. Los resultados finales deberían ser independientes de cualquier otra condición experimental. En consecuencia, la hipótesis de la adaptación predice que si se utiliza un número constante de bacterias y de fagos en cada cultivo, y si el tiempo de incubación es constante, se deberían observar fluctuaciones leves en el número de células resistentes entre las diferentes placas y entre diferentes experimentos.

Hipótesis 2. Mutación aleatoria. Por otro lado, si la resistencia se adquiere como consecuencia de mutaciones aleatorias, sin el estímulo de la incubación con el bacteriófago, ésta se producirá a una tasa baja durante la incubación en el medio líquido *antes de la siembra*, es decir, antes de que se produzca cualquier contacto con los fagos. Si las mutaciones se producen *pronto* durante la incubación en el medio líquido, la reproducción posterior de la bacteria mutante producirá, en términos relativos, grandes cantidades de células resistentes. Cuando la mutación se produce *tarde* durante esta incubación, habrá muchas menos células resistentes. En consecuencia, la hipótesis de la mutación aleatoria predice que el número de células resistentes fluctuará de manera significativa de un experimento a otro, y de un tubo a otro, reflejando de los distintos tiempos en los que se ha producido la mayoría de mutaciones espontáneas durante el cultivo líquido.

La Tabla 15.1 muestra un grupo de valores representativos de los experimentos de Luria-Delbrück. La columna central muestra el número de mutantes recuperados de una serie de alícuotas que provienen de un único cultivo líquido. En un cultivo grande, las diferencias experimentales se igualan, ya que el cultivo está mezclándose constantemente. Por lo tanto, estos valores sirven de control ya que el número de mutantes en cada alícuota debería ser casi idéntico. Como se ha predicho, se observa poca fluctuación. Sin embargo, la columna de la derecha muestra el número de mutantes resistentes recuperados de 10 cultivos líquidos independientes. La amplitud de la fluctuación de estos valores apoyará a una sola de estas hipótesis alternativas. Por este motivo, este experimento se denomina **prueba de la fluctuación**. La fluctuación se mide mediante la varianza, que es un cálculo estadístico.

Como se ve en la columna de la derecha, en el experimento de Luria-Delbrück *se observó* una gran fluctuación entre los cultivos independientes, lo que apoya la hipótesis de que las mutaciones surgen espontáneamente, incluso en ausencia de presión selectiva, y de que se heredan de manera estable.

Aunque ya hace tiempo que se ha aceptado el concepto de mutación espontánea en virus, en bacterias y en organismos superiores, la posibilidad de que los organismos también sean capaces de seleccionar un conjunto específico de mutaciones que se produzcan como resultado de presiones ambientales ha

TABLA 15.1 **EXPERIMENTO DE LURIA-DELBRUCK, QUE DEMUESTRA QUE LAS MUTACIONES ESPONTÁNEAS SON LA FUENTE DE LA RESISTENCIA A FAGOS EN BACTERIAS**

Número de bacterias resistentes a T1		
Número de muestra	Mismo cultivo (control)	Cultivos diferentes
1	14	6
2	15	5
3	13	10
4	21	8
5	15	24
6	14	13
7	26	165
8	16	15
9	20	6
10	13	10
Media	16,7	26,2
Varianza	15,0	2.178,0

Fuente: según Luria y Delbrück (1943).

continuado intrigando a los genéticos. Algunas investigaciones recientes y controvertidas han sugerido que bajo determinadas condiciones de estrés nutricional como el ayuno, las bacterias podrían ser capaces de activar mecanismos que generan un estado de hipermutabilidad en los genes que, una vez mutados, incrementarían su supervivencia. Las conclusiones de estos estudios son todavía fuente de debate, pero mantienen vivo el interés por la posibilidad de la mutación adaptativa.

Clasificación basada en la localización de la mutación

Las mutaciones pueden clasificarse según el tipo celular o la localización cromosómica en que se producen. Las **mutaciones somáticas** se pueden producir en cualquier célula del cuerpo excepto en las germinales. Las **mutaciones germinales** se producen en los gametos. Las **mutaciones autosómicas** se producen en genes localizados en los autosomas, mientras que las **mutaciones ligadas a X** se producen en genes localizados en el cromosoma X.

Las mutaciones surgidas en células somáticas no se transmiten a las generaciones posteriores. Cuando se genera una **mutación autosómica recesiva**, es probable que no tenga ningún resultado fenotípico detectable. Es probable que la expresión de la mayoría de estas mutaciones quede enmascarada por el alelo dominante. Las mutaciones somáticas tendrán un efecto mayor si son dominantes o, en los machos, si están ligadas al cromosoma X, ya que es más probable que estas mutaciones se expresen inmediatamente. Del mismo modo, el efecto será mayor si la mutación somática o ligada a X se ha producido pronto en el desarrollo, cuando un pequeño número de células indiferenciadas se replican para originar los diversos tejidos y órganos diferenciados. A menudo, las mutaciones dominantes producidas en tejidos adultos quedan enmascaradas por los miles de células no mutantes del mismo tejido que realizan la función normal.

La importancia de las mutaciones producidas en los gametos es mayor puesto que se transmiten a la descendencia como parte de la línea germinal. Éstas tienen el potencial de expresarse en todas las células del descendiente. Las **mutaciones autosómicas dominantes** se expresarán en el fenotipo de la primera generación. Las **mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X**, surgidas en los gametos de una hembra homogamética, pueden expresarse en los descendientes machos, que son hemicigotos. Debido a la heterozigosidad, la aparición de una mutación autosómica recesiva en los gametos tanto de machos como de hembras (incluso los que producen un alelo letal) puede pasar desapercibidas durante muchas generaciones, hasta que el alelo resultante se haya extendido por la población. Generalmente el nuevo alelo se manifestará solo cuando un apareamiento aleatorio reúna dos copias de éste en homocigosis. En algunos casos un alelo mutante recesivo puede conllevar un fenotipo detectable cuando se encuentra en heterocigosis o en hemicigosis. Esto se produce en una situación conocida como **haploinsuficiencia**, en la que el alelo silvestre restante no puede sintetizar un nivel suficiente de producto génico normal para desempeñar su función. Algunas enfermedades humanas son consecuencia de haploinsuficiencia en genes que codifican factores de transcripción.

Seminario Web 15.1
Mutaciones a nivel de DNA

Clasificación basada en el tipo de cambio molecular

A menudo los genéticos clasifican las mutaciones génicas según los cambios nucleotídicos que generan la mutación. El cambio de un par de bases por otro en una molécula de DNA se denomina **mutación puntual**[1] o de **sustitución de bases** (Figura 15.1). El cambio de un nucleótido de un triplete en una porción de un gen que codifica una proteína puede resultar en la generación de un nuevo triplete que codifique un aminoácido diferente en el producto proteico. Si ocurre esto, se denomina **mutación de cambio de sentido**. Una segunda posibilidad es que el triplete cambie en un codón de terminación (*stop*), lo que resulta en la terminación de la traducción de la proteína, lo que se conoce como **mutación sin sentido**. En el Capítulo 13 también se discuten las mutaciones sin sentido. Si la mutación puntual altera un codón pero no resulta en un cambio aminoacídico en esa posición de la proteína (debido a la degeneración del código genético, puede considerarse una **mutación silenciosa**.

A menudo verá otros dos términos usados para describir sustituciones de bases. Si una pirimidina reemplaza a una pirimidina o una purina reemplaza a una purina, se ha producido una **transición**. Si se intercambian una purina y una pirimidina, se ha producido una **transversión**.

Otro tipo de cambios que pueden producirse es la inserción o la deleción de uno o más nucleótidos en cualquier lugar del gen. Como se ilustra en la Figura 15.1, la pérdida o la adición de una sola letra provoca el cambio de todas las palabras de tres letras posteriores. Estas mutaciones se denominan **mutaciones de cambio de fase** ya que se altera la fase de lectura de los tripletes durante la traducción. En el Capítulo 13 también se discuten las mutaciones de cambio de fase. Las mutaciones de cambio de fase se producirán para cualquier número de bases añadidas o delecionadas excepto para los múltiplos de tres, que restablecerán la fase de lectura inicial. La analogía de la Figura 15.1 demuestra que las inserciones y las deleciones tienen el potencial de cambiar todos los tripletes posteriores del gen. Es probable que uno de los muchos tripletes alterados sea UAA, UAG, o UGA, un codón de terminación. Cuando se encuentra uno de estos tripletes durante la traducción, se termina la síntesis del polipéptido. Obviamente, los resultados de las mutaciones de cambio de fase pueden ser muy graves.

---

[1] *Nota del traductor:* estas mutaciones también se denominan **mutaciones de sentido incorrecto.**

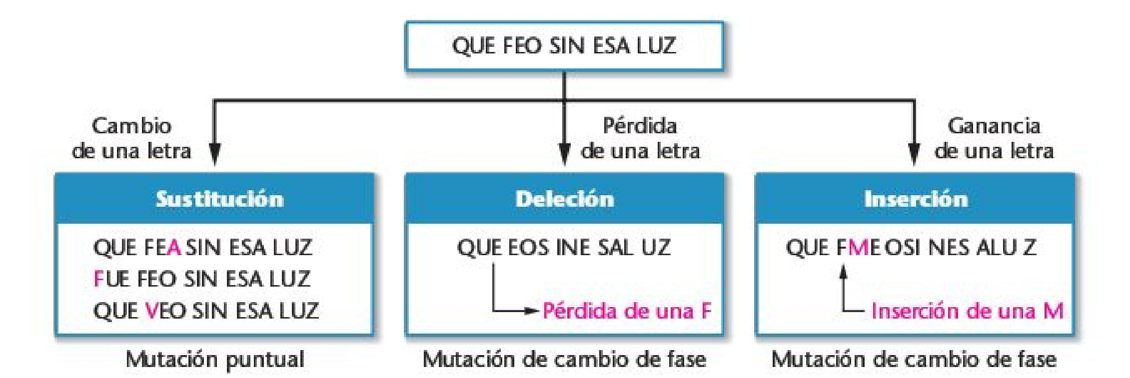


FIGURA 15.1 Analogía de los efectos de la substitución, la deleción y la inserción de una letra en una frase formada por palabras de tres letras[2], que demuestra las mutaciones puntuales y de cambio de fase de lectura.

Clasificación basada en los efectos fenotípicos

En función del tipo y la localización, las mutaciones pueden tener una amplia gama de efectos fenotípicos, desde mutaciones silenciosas hasta letales dominantes.

Como se discutió en el Capítulo 4, una **mutación de pérdida de función** es aquella que elimina la función de un producto génico. Cualquier tipo de mutación, desde una mutación puntual hasta una deleción de todo el gen, puede generar una pérdida de función. Estas mutaciones también se conocen como **mutaciones nulas** o ***knockouts* génicos** (la expresión inglesa *knockout* no suele traducirse y significa dejar fuera de combate). Una mutación de pérdida de función puede ser dominante o recesiva. Una mutación dominante de pérdida de función puede ser consecuencia de la presencia de un producto proteico defectivo que se una al producto génico normal, que también se encuentra en el organismo, o que lo inhiba. Una mutación de ganancia de función resulta en un producto génico con una función nueva. Esto puede ser debido a un cambio aminoacídico en la secuencia de la proteína que le confiera una nueva actividad, o puede ser el resultado de una mutación en la región reguladora del gen que conduzca a una expresión anormal del mismo, ya sea en cantidad de producto génico, o en el momento y el lugar de expresión.

Las mutaciones más fáciles de observar son las que afectan a un **carácter morfológico**. Estas mutaciones también se denominan mutaciones observables y se reconocen por su capacidad de alterar el fenotipo normal o silvestre. Por ejemplo, todos los caracteres de los guisantes de Mendel y mucha de la variación genética encontrada en las investigaciones de *Drosophila* encajan en esta designación, ya que causan cambios evidentes en la morfología del organismo.

Una segunda categoría amplia de mutaciones incluye a aquellas que muestran efectos **nutricionales** o **bioquímicos**. Un ejemplo de mutación nutricional típica es la incapacidad de sintetizar un aminoácido o una vitamina en bacterias y en hongos. En la especie humana, la hemofilia y la anemia falciforme son ejemplos de mutaciones bioquímicas. Aunque estas mutaciones no siempre afectan a caracteres morfológicos, pueden tener un efecto sobre el bienestar y en la supervivencia del individuo afectado.

Una tercera categoría son las mutaciones que afectan al patrón de comportamiento de un organismo. Por ejemplo, en animales se puede alterar el comportamiento de apareamiento o los ritmos circadianos. A menudo es difícil analizar el efecto primario de las **mutaciones del comportamiento**. Por ejemplo, el comportamiento de apareamiento de la mosca de la fruta puede verse perjudicado si no puede batir las alas. Sin embargo, el defecto podría estar en los músculos para el vuelo, en los nervios que los inervan o en el cerebro, donde se originan los impulsos nerviosos que inician el movimiento de las alas. El estudio del comportamiento y de los factores genéticos que los influyen se ha beneficiado sobremanera de las investigaciones de mutaciones del comportamiento.

Todavía otro tipo de mutaciones es el que puede afectar a la regulación de los genes. Por ejemplo, como veremos en la discusión del operón *lac* del Capítulo 16, un gen regulador puede producir un producto que controle la transcripción de otros genes. En otros casos, una región del DNA cercana o alejada del gen puede modular su actividad. En cualquier caso, una mutación en un gen regulador o en una región que controle el gen altera los procesos normales de regulación y activa o desactiva permanentemente un gen. El conocimiento de la regulación genética ha dependido del estudio de estas **mutaciones de regulación**.

También es posible que una mutación interrumpa un proceso esencial para la supervivencia del organismo. Es este caso, se denomina **mutación letal**. Por ejemplo, una bacteria mutante que haya perdido la capacidad de sintetizar un aminoácido esencial dejará de crecer si está en un medio que no contenga dicho aminoácido, y al final morirá. Diversas enfermedades bioquímicas en la especie humana también son buenos ejemplos de mutaciones letales. Por ejemplo, la enfermedad de Tay-Sachs y la de Huntington están causadas por mutaciones que son letales, pero en momentos diferentes del ciclo biológico de los seres humanos.

[2] *Nota del traductor:* el ejemplo original en inglés es: *THE CAT SAW THE DOG* (el gato vio al perro), y en las columna de substituciones (mutaciones puntuales) *THE CAT SAW THE HOG* (el gato vio al erizo), *THE BAT SAW THE DOG* (el murciélago vio al perro), y *THE CAT SAT THE DOG* (el gato entristeció al perro). En las columnas de deleción y substitución se pierde el sentido de la frase, como en castellano.

Otro aspecto interesante de las mutaciones es cuando su expresión depende del ambiente en el que se encuentre el organismo. Estas mutaciones se denominan **mutaciones condicionales** porque aunque la mutación esté presente en el genoma del organismo, ésta solo se puede detectar bajo determinadas condiciones. Las **mutaciones de sensibilidad a la temperatura** están entre los mejores ejemplos de este tipo de mutaciones. A temperatura «permisiva», el producto del gen mutante funciona con normalidad, pero pierde su capacidad funcional cuando está a temperatura «restrictiva». Por lo tanto, cuando los organismos se cambian de temperatura permisiva a restrictiva, se manifiesta el efecto de la mutación. En el Capítulo 4 también se discuten las mutaciones de sensibilidad a la temperatura (véase la Figura 4.18). El estudio de mutaciones condicionales ha sido importante en genética experimental, especialmente para entender la función de los genes esenciales para la división celular. En el Capítulo 21 se discute la utilización de mutantes sensibles a la temperatura en la disección de genes implicados en el ciclo celular.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que las mutaciones se producen espontáneamente, en ausencia de presión selectiva?

15.2 La tasa de mutación espontánea varía enormemente entre organismos

El análisis de la **tasa de mutación** espontánea en diversos organismos muestra algunos puntos interesantes (Tabla 15.2). Primero, la tasa de mutación espontánea es extremadamente baja en todos los organismos estudiados. Segundo, la tasa varía considerablemente entre los diferentes organismos. Tercero, incluso dentro de una misma especie, la tasa de mutación espontánea varía entre genes diferentes.

Los genes víricos y bacterianos padecen un promedio de mutaciones espontáneas en 1 de cada 100 millones (10^{-8}) de divisiones celulares aproximadamente. Aunque *Neurospora* muestra una tasa similar, maíz, *Drosophila* y la especie humana muestran una tasa de mutación espontánea varios órdenes de magnitud superior. Los genes estudiados en estos grupos tienen, en promedio, entre 1/1.000.000 y 1/100.000 (10^{-6} y 10^{-5}) mutaciones por gameto producido. Los genes de ratón tienen aún otro orden de magnitud superior en su tasa de mutación espontánea, entre 1/100.000 y 1/10.000 (10^{-5} y 10^{-4}). No se sabe con certeza el por qué de esta variación en la tasa de mutación. La variación entre organismos podría reflejar la eficiencia relativa de sus sistemas de corrección de pruebas y de reparación del DNA. En este mismo capítulo trataremos de estos sistemas de reparación.

Mutaciones deletéreas en humanos

Es probable que la inmensa mayoría de mutaciones se produzcan en las grandes porciones del genoma que no contienen genes. Se considera que son **mutaciones neutrales**, porque generalmente no afectan productos génicos. Si bien esta información es de gran interés para los genéticos, quizás es más importante la información sobre la base en que se producen mutaciones espontáneas deletéreas. La tasa en que se producen estas mutaciones en nuestra especie presenta un gran interés. Durante décadas, ha sido difícil determinar esta tasa a nivel nucleotídico. Sin embargo, las recientes técnicas moleculares, incluyendo la secuenciación de DNA, han permitido la realización de estimaciones precisas. La tasa de mutaciones deletéreas en humanos es sorprendentemente alta, al menos de 1,6 cambios genéticos deletéreos por individuo y por generación.

James Crow discute de manera clara y profunda sobre las posibles consecuencias de las mutaciones deletéreas para nuestra especie y los métodos utilizados para estimarlas en un artículo corto publicado en 1999 en la revista *Nature*. El Dr. Crow es uno de los pioneros y de lo investigadores más destacados en la investigación de mutaciones. Su artículo, «La probabilidad de perder en la ruleta genética», se reproduce traducido en la página 367.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo saben los genéticos que las tasas de mutación deletérea son para un organismo concreto o para un gen particular de un organismo?

15.3 Las mutaciones espontáneas surgen de errores de la replicación y de la modificación de bases

En esta sección resumiremos el proceso que conduce a las mutaciones espontáneas. Es útil recordar que muchas de las modificaciones de bases que se producen durante la mutagénesis espontánea también suceden durante la mutagénesis inducida, aunque en éste último caso se producen a un ritmo mayor.

Errores de replicación del DNA

Como vimos en el Capítulo 11, el proceso de replicación del DNA es imperfecto. Ocasionalmente, las DNA polimerasas insertan nucleótidos incorrectos en la cadena replicada del DNA. Si bien las DNA polimerasas pueden corregir la mayor parte de estos errores de replicación usando su capacidad inherente de lectura de pruebas 3′-5′, después de la replicación pueden permanecer nucleótidos erróneamente incorporados. Si los mecanismos de reparación del DNA (que se discuten posteriormente en este capítulo) no detectan o corrigen estos errores, pueden conducir a una mutación. El hecho que las bases puedan adoptar diversas formas, conocidas como **tautómeros**,

TABLA 15.2 TASA DE MUTACIONES ESPONTÁNEAS EN VARIOS LOCI DE DIVERSOS ORGANISMOS

Organismo	Carácter	Gen	Tasa	Unidades
Bacteriófago T2	Inhibición de lisis	$r \rightarrow r^+$	1×10^{-8}	Por replicación génica
	Tipo de huésped	$h^+ \rightarrow h$	3×10^{-9}	
	Fermentación de lactosa	$lac^- \rightarrow lac^+$	2×10^{-7}	
	Fermentación de lactosa	$lac^+ \rightarrow lac^-$	2×10^{-6}	
	Resistencia al fago T1	*Tl-s* → *Tl-r*	2×10^{-8}	
	Necesidad de histidina	$his^+ \rightarrow his^-$	2×10^{-6}	
	Independencia a histidina	$his^- \rightarrow his^+$	4×10^{-8}	
E. coli	Dependencia a estreptomicina	*str-s* → *str-d*	1×10^{-9}	Por división celular
	Sensibilidad a estreptomicina	*str-d* → *str-s*	1×10^{-8}	
	Resistente a radiación	*rad-s* → *rad-r*	1×10^{-5}	
	Independencia a leucina	$leu^- \rightarrow leu^+$	7×10^{-10}	
	Independencia a arginina	$arg^- \rightarrow arg^+$	4×10^{-9}	
	Independencia a triptófano	$trp^- \rightarrow trp^+$	6×10^{-8}	
Salmonella typhimurium	Independencia a triptófano	$trp^- \rightarrow trp^+$	5×10^{-8}	Por división celular
Diplococcus pneumoniae	Resistencia a penicilina	$pen^s \rightarrow pen^r$	1×10^{-7}	Por división celular
Chlamydomonas reinhardi	Sensibilidad a estreptomicina	$str^r \rightarrow str^s$	1×10^{-6}	Por división celular
Neurospora crassa	Necesidad de inositol	$inos^+ \rightarrow inos^-$	8×10^{-8}	Frecuencia de mutación entre las esporas asexuales
	Independencia de adenina	$ade^- \rightarrow ade^+$	2×10^{-8}	
Zea mays	Granos encogidos	$sh^+ \rightarrow sh^-$	1×10^{-6}	Por gameto y por generación
	Púrpura	$pr^+ \rightarrow pr^-$	1×10^{-5}	
	Sin color	$c^+ \rightarrow c^-$	2×10^{-6}	
	Azucarada	$su^+ \rightarrow su^-$	2×10^{-6}	
Drosophila melanogaster	Cuerpo amarillo	$y^+ \rightarrow y$	1.2×10^{-6}	Por gameto y por generación
	Ojos blancos	$w^+ \rightarrow w$	4×10^{-5}	
	Ojos marrones	$bw^+ \rightarrow bw$	3×10^{-5}	
	Cuerpo de color ébano	$e^+ \rightarrow e$	2×10^{-5}	
	Sin ojos	$ey^+ \rightarrow ey$	6×10^{-5}	
Mus musculus	Pelaje mezclado	$s^+ \rightarrow s$	3×10^{-5}	Por gameto y por generación
	Color del pelaje diluido	$d^+ \rightarrow d$	3×10^{-5}	
	Pelaje marrón	$b^+ \rightarrow b$	8.5×10^{-4}	
	Ojos rosados	$p^+ \rightarrow p$	8.5×10^{-4}	
Homo sapiens	Hemofilia	$h^+ \rightarrow h$	2×10^{-5}	Por gameto y por generación
	Enfermedad de Huntington	$Hu^+ \rightarrow Hu$	5×10^{-6}	
	Retinoblastoma	$R^+ \rightarrow R$	2×10^{-5}	
	Epiloya	$Ep^+ \rightarrow Ep$	1×10^{-5}	
	Aniridia	$An^+ \rightarrow An$	5×10^{-6}	
	Acondroplasia	$A^+ \rightarrow A$	5×10^{-5}	

también incrementa la probabilidad de emparejamientos erróneos durante la replicación del DNA. Los errores de replicación debidos a emparejamientos erróneos suelen conducir a mutaciones puntuales.

Desplazamiento de la replicación

Además de a estas mutaciones puntuales, la replicación del DNA también puede introducir pequeñas inserciones o deleciones. Estas mutaciones se pueden producir cuando la cadena de DNA molde forma un lazo y se desplaza durante la replicación, o cuando la DNA polimerasa resbala (se desplaza) o tartamudea (repite nucleótidos) durante la replicación. La DNA polimerasa puede perderse los nucleótidos del lazo introduciendo una pequeña deleción en la cadena nueva. Si la DNA polimerasa introduce de manera repetida nucleótidos que no se encuentran en la cadena molde, introducirá una inserción de un nucleótido o de más de uno, generando un lazo no emparejado en la cadena recién sintetizada. Las inserciones y las deleciones pueden producir mutaciones de cambio de fase de lectura o la adición o la deleción de aminoácidos en el producto génico.

El desplazamiento de la replicación se puede producir en cualquier lugar en el DNA, pero parece tener una clara prefe-

Las probabilidades de perder a la ruleta genética*

La tasa a la que se producen mutaciones deletéreas en un genoma es claramente una cuestión de interés, y más todavía si se trata del nuestro. Esto es especialmente importante si, como algunos han argumentado[1], la tasa es alta en algunas especies, a razón de varias mutaciones nuevas cada generación. Sin embargo, la tasa de mutaciones deletéreas ha sido difícil de medir, y no hay estimaciones convincentes para ningún vertebrado. En la página 344 de este volumen[2], Eyre-Walker y Keightley dan la primera estimación en humanos, chimpancés y gorilas.

Dar una estimación de la tasa total de mutaciones es relativamente sencillo. Las mutaciones neutrales, las que no benefician ni perjudican al organismo que las lleva, se acumulan durante generaciones a una tasa que es igual a la de mutación**. La tasa de mutación puede determinarse mediante la tasa de cambios en las regiones consideradas neutrales: áreas del genoma, como intrones y pseudogenes, que no se traducen a proteínas. Para los mamíferos, estas tasas, extrapoladas a todo el genoma, conducen a números enormes, del orden de 100 mutaciones nuevas por individuo[1]. Por supuesto que no todas ellas pueden ser deletéreas, pero nadie sabe en que proporción se encuentran. En principio, esta proporción puede determinarse comparando la tasa más baja de cambio evolutivo de todo el genoma con la tasa más alta esperada bajo condiciones neutrales; pero esto implica indeterminaciones estadísticas y cuantiosas secuenciaciones[4].

Eyre-Walker y Keightley[2] han hecho factible este análisis al concentrarse en las regiones que codifican proteínas. Han medido los cambios aminoacídicos de 46 proteínas en la línea evolutiva de los humanos tras su divergencia de los chimpancés. Entre 41.471 nucleótidos, encontraron 143 sustituciones no sinónimas, mutaciones en las que el cambio de una base de DNA por otra cambia un aminoácido y, por consiguiente, la proteína final hecha por ese gen. Si hubiese evolucionado a una tasa neutral, se esperarían 231 sustituciones de este tipo. La diferencia, 88 sustituciones (el 38%), es una estimación del número de mutaciones deletéreas que se han eliminado por selección natural y que, por lo tanto, no han contribuido a la población contemporánea.

Al trasladar estos números a tasas de mutación, se obtiene una tasa total de 4,2 mutaciones por persona y por generación, y una tasa de mutaciones deletéreas de 1,6. La tasa de los chimpancés y los gorilas es muy parecida, siendo las deletéreas de 1,7 y 1,2 respectivamente. Los autores consideraron que estas especies tienen 60.000[3] genes, y que el tiempo de generación es de 25 años. Probablemente, por diversos motivos el valor de 1,6 es una estima a la baja. Por ejemplo, no se consideran las mutaciones que se producen fuera de la región codificante, y es de esperar que algunas de estas regiones, como las que controlan la expresión génica, estén sujetas a selección natural. El número de genes también puede ser una estimación a la baja. La presencia de mutaciones que incrementen la eficacia biológica también provocará una estima a la baja de las mutaciones deletéreas. Una estimación menos conservativa y probablemente más realística dobla este valor, lo que significa tres nuevas mutaciones deletéreas por persona y por generación.

¿Qué relevancia tiene? Cada mutación deletérea puede ser eliminada de la población mediante la muerte prematura o por una reducción relativa del éxito reproductivo, una «muerte genética»[5]. Esto implica tres muertes genéticas por persona! ¿Por qué no nos hemos extinguido? Se ha estimado que si las mutaciones perjudiciales se eliminasen de forma independiente, como en una especie asexual, la eficacia biológica se reduciría una fracción de e^{-3}, o el 5 por ciento, del valor libre de la mutación[6], lo que conduciría inevitablemente a la extinción de las especies con la capacidad reproductora limitada. Una solución es que las mutaciones se eliminen en grupos. Esto sucede si la selección funciona de tal manera que los individuos con más mutaciones son eliminados de manera preferente, por ejemplo si las mutaciones perjudiciales interaccionan. Pero un proceso como éste sólo puede funcionar en especies sexuales, en las que las mutaciones se barajan cada generación por recombinación genética[1,7]. La existencia de una elevada tasa de mutaciones deletéreas refuerza el argumento de que una de las principales ventajas del sexo es que es un modo eficiente de eliminar las mutaciones perjudiciales[1]. Esto vuelve a plantear la posibilidad de una disminución de la eficacia biológica o incluso de la extinción en especies raras debido a la presencia de demasiadas mutaciones perjudiciales[8].

Probablemente, los humanos nos hemos aprovechado en el pasado de la capacidad de la reproducción sexual para reducir el efecto de la alta tasa de mutación sobre la eficacia biológica. Estos últimos años la intensidad de la selección natural se ha reducido enormemente, especialmente en los sitios donde el alto nivel de vida permite que la mayor parte de niños alcancen la edad reproductora. Ello podría sugerir que la selección natural descartará las mutaciones más lentamente de lo que estas se acumulen. Este efecto puede verse acentuado por la tendencia de los varones de empezar a reproducirse, o de continuar reproduciéndose, más tardíamente durante la vida, porque el esperma de los varones mayores contiene más mutaciones de cambio de bases[8]. En una época de rápida mejora ambiental, sólo se pueden hacer conjeturas de cómo este empeoramiento genético afectará nuestra salud.

Eyre-Walker y Keightley[2] han observado que la proporción de mutaciones perjudiciales en los 46 genes de su estudio es mayor en humanos que en los genes equivalentes de roedores. La explicación que proponen es que en la población se han fijado mutaciones ligeramente deletéreas mediante un proceso denominado deriva genética aleatoria, en periodos de la historia humana en que la población reproductora era escasa, especialmente durante los «cuellos de botella» genéticos. Esto incrementaría cualquier efecto que las mutaciones acumuladas estén teniendo en la salud de los humanos actuales. ¿Son consecuencia de la acumulación de mutaciones los dolores de cabeza, los problemas de estómago, la falta de visión y los otros achaques que padecemos? Probablemente, pero con los conocimientos actuales sólo podemos especular.

James F. Crow, Departamento de Genética, Universidad de Wisconsin, Madison, WI 93706.

[1] Kondrashov, A.S. *J. Theor. Biol.* 175:583-94 (1995).
[2] Eyre-Walker, A. & Keightley, P.D. *Nature* 397:344-47 (1999).
[3] Kimura, M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (Cambridge University Press, 1983).
[4] Kondrashov, A.S. & Crow, J.F. *Hum. Mutat.* 2:229-34 (1993).
[5] Muller, H.J. *Am. J. Hum. Genet.* 2:111-76 (1950).
[6] Kimura, M. & Maruyama, T. *Genetics* 54:1337-51 (1966).
[7] Crow, J.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8380-86 (1997).
[8] Lande, R. *Evolution* 48:1460-69 (1994).

* *Nota del traductor:* para los lectores interesados en conocer los términos exactos utilizados por James F. Crow, la referencia del artículo original se encuentra al final del artículo traducido.

** *Nota del traductor:* las estimaciones actuales indican que estas tres especies tienen sólo unos 24.000 genes.

rencia para las regiones que contienen secuencias repetidas. Las secuencias repetidas son puntos calientes para la mutación del DNA, y en algunos casos contribuyen a enfermedades hereditarias (que se discuten en la Sección 15.5). La hipermutabilidad de las secuencias repetidas en las regiones no codificantes del genoma también es la base para los métodos actuales de análisis forense del DNA. (Véase el Capítulo 22.)

Cambios tautoméricos

En 1953, inmediatamente después de proponer una estructura molecular del DNA, Watson y Crick publicaron un artículo en el que exponían las implicaciones genéticas de esta estructura. Reconocían que las purinas y las pirimidinas encontradas en el DNA pueden existir en formas **tautoméricas**; es decir, las bases nitrogenadas pueden existir en formas químicas alternativas denominadas isómeros estructurales, diferenciándose en un sólo protón desplazado en la molécula. Los tautómeros con importancia biológica son las formas ceto-enol de la timidina y la guanina, y las forman amino-imino de la citosina y la adenina. Debido a que estos desplazamientos cambian la estructura de enlace de la molécula, Watson y Crick sugirieron que los **cambios tautoméricos** pueden resultar en cambios en el emparejamiento de bases, o mutaciones.

Los tautómeros más estables de las bases nitrogenadas dan por resultado los emparejamientos de bases estándares que sirven de base al modelo de doble hélice del DNA. Los tautómeros transitorios menos frecuentes[3] pueden formar puentes de hidrógeno con bases no complementarias. Sin embargo, el emparejamiento se produce siempre entre una pirimidina y una purina. La Figura 15.2 compara las relaciones de emparejamiento normal entre bases con los emparejamientos no ortodoxos poco frecuentes. Como se puede ver, pueden formarse, entre otros, emparejamientos T≡G y C═A anómalos.

El efecto que conduce a la mutación se produce durante la replicación del DNA, cuando un tautómero poco frecuente de la cadena molde se empareja con una base no complementaria. En la siguiente ronda de replicación, se separan los miembros del par de bases «mal emparejado», y cada uno especifica su base complementaria normal. El resultado final en una mutación puntual (Figura 15.3).

Despurinación y desaminación

Algunas de las causas más comunes de mutaciones espontáneas son debidas a daños en las bases del DNA. La **despurinación** implica la pérdida de bases nitrogenadas en una molécula helicoidal de doble cadena de DNA intacta. En la mayor parte de

(a) Disposición del emparejamiento de las bases normales

Timina (ceto) Adenina (amino)

Citosina (amino) Guanina (ceto)

(b) Disposición de los emparejamientos de las bases anómalas



Citosina (imino) Adenina (amino)

FIGURA 15.2 Comparación de las relaciones de emparejamiento de bases normales (a) con los emparejamientos anómalos producidos como resultado de cambios tautoméricos (b). Las puntas de flecha señalan los sitios de unión del azúcar pentósido.

[3] *Nota del traductor:* las formas más frecuentes son la forma ceto para la timina y la guanina, y la forma amino para la citosina y la adenina. Las menos frecuentes son las formas enol e imino para estas mismas bases nitrogenadas, respectivamente.

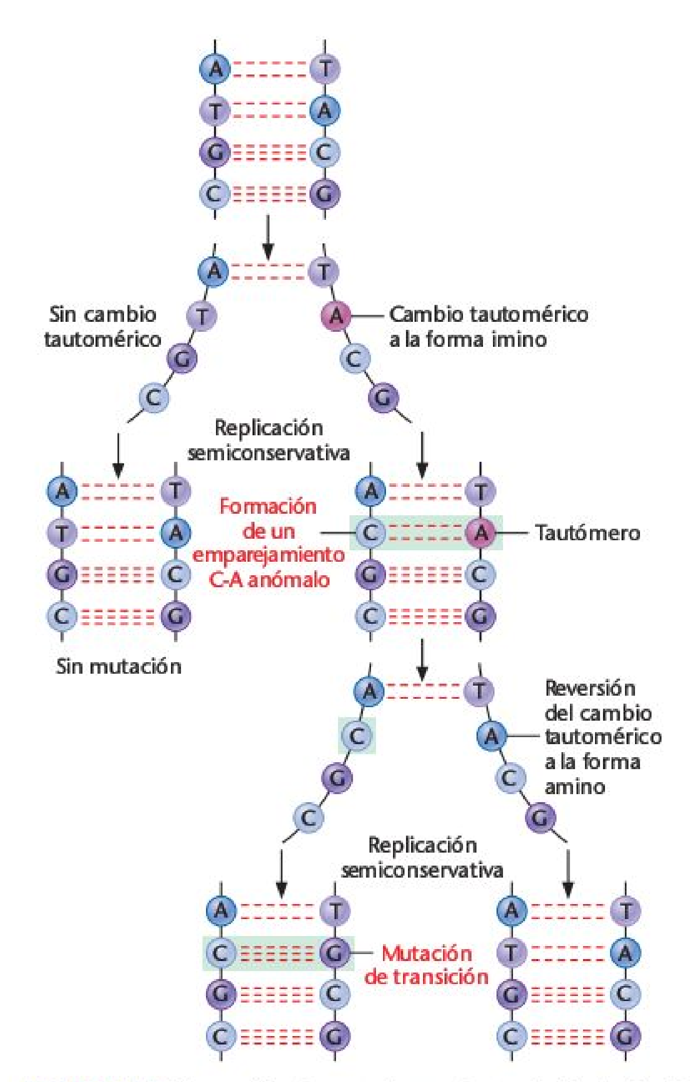


FIGURA 15.3 Formación de mutaciones de transición de A═T a C≡G como consecuencia de un cambio tautomérico en la adenina.

los cases, estos sucesos implican purinas, tanto guaninas como adeninas. Estos nucleótidos pierden su base nitrogenada al romperse el enlace glucosídico que une el 1′-C de la desoxirribosa y la posición número 9 del anillo de la purina. Esto conduce a la generación de un **sitio apurínico (sitios AP)** en una cadena del DNA. Se ha estimado que en el DNA de las células de mamífero en cultivo se forman diariamente miles de estas lesiones espontáneas. Si no se reparan los sitios AP, no habrá ninguna base en esa posición que actúe de molde durante la replicación del DNA. En consecuencia, en ese sitio la DNA polimerasa introducirá un nucleótido al azar.

En el proceso de **desaminación**, un grupo amino de la adenina o de la citosina se convierte en un grupo ceto (Figura 15.4). En estos casos, la citosina se convierte en uracilo y la adenina en hipoxantina. El efecto más importante de estos cambios es la alteración de la especificidad de emparejamiento de estas dos bases durante la replicación del DNA. Por ejemplo, normalmente la citosina se empareja con la guanina. Después de su conversión en uracilo, que se empareja con la adenina, el par G≡C original se convertirá en un par A═U y, tras otro ciclo de replicación, en un par A═T. Cuando se desamina la adenina, el par A═T original se convierte en un par G≡C debido a que la hipoxantina se empareja de manera natural con la citosina. La desaminación se puede producir de manera espontánea o como resultado de un tratamiento con un mutágeno químico como el ácido nitroso (HNO_2).

Daño oxidativo

El DNA también puede sufrir daños debidos a los subproductos de los procesos celulares normales. Estos subproductos incluyen diversos tipos de oxígeno reactivo (oxidantes electrofílicos) que se generan durante la respiración aeróbica normal. Por ejemplo, los superóxidos ($O_2^{\cdot -}$), los radicales hidroxilo (·OH), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se generan durante el metabolismo celular, amenazan constantemente la integridad del DNA. Los oxidantes reactivos, que también se generan por exposición a radiación de alta energía, pueden producir más de 100 tipos diferentes de modificaciones químicas en el DNA, incluyendo modificaciones de bases que conducen a emparejamientos erróneos durante la replicación.

Transposones

Los elementos genéticos transponibles (transposones) también producen mutaciones espontáneas en eucariotas y en procariotas. Posteriormente en este mismo capítulo se discutirán los transposones (Sección 15.8).

15.4 Las mutaciones inducidas se producen por daños del DNA causados por agentes químicos y radiaciones

Todas las células de la Tierra están expuestas a una enorme cantidad de agentes que tienen el potencial de dañar el DNA y causar mutaciones (**mutágenos**). Algunos de estos agentes, como algunas toxinas de hongos y la luz ultravioleta, son componentes naturales de nuestro ambiente. Otros, incluyendo algunos contaminantes industriales, los rayos X usados en medicina y los productos químicos que hay en el humo del tabaco, pueden considerarse como no naturales o como adiciones producidas por los humanos al mundo moderno. Mirando su lado positivo, los genéticos utilizan algunos mutágenos para analizar los genes y sus funciones. (Véase el Capítulo 21.) A continuación se resumen los mecanismos por los que algunos de estos agentes naturales y no naturales conducen a mutaciones.

Análogos de bases

Estos mutágenos químicos pueden sustituir a las purinas o a las pirimidinas durante la biosíntesis de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, el **5-bromouracilo (5-BU)**, un derivado del ura-

FIGURA 15.4 Desaminación de la citosina y la adenina, que dan lugar a nuevos emparejamiento de bases y a mutaciones. La citosina se convierte en uracilo, que se empareja con la adenina. La adenina se convierte en hipoxantina, que se empareja con la citosina.

cilo, se comporta como una análogo de la timidina y se encuentra halogenado en la posición número 5 del anillo de pirimidina. Si la 5-BU se une químicamente a la desoxirribosa, se forma el nucleósido análogo **breomodeoxiuridina** (**BrdU**). La Figura 15.5 compara la estructura de este análogo con la de la timina. La presencia del átomo de bromo en lugar del grupo metilo incrementa la probabilidad de que se produzca un cambio tautomérico. Si en el DNA se incorpora 5-BU en vez de

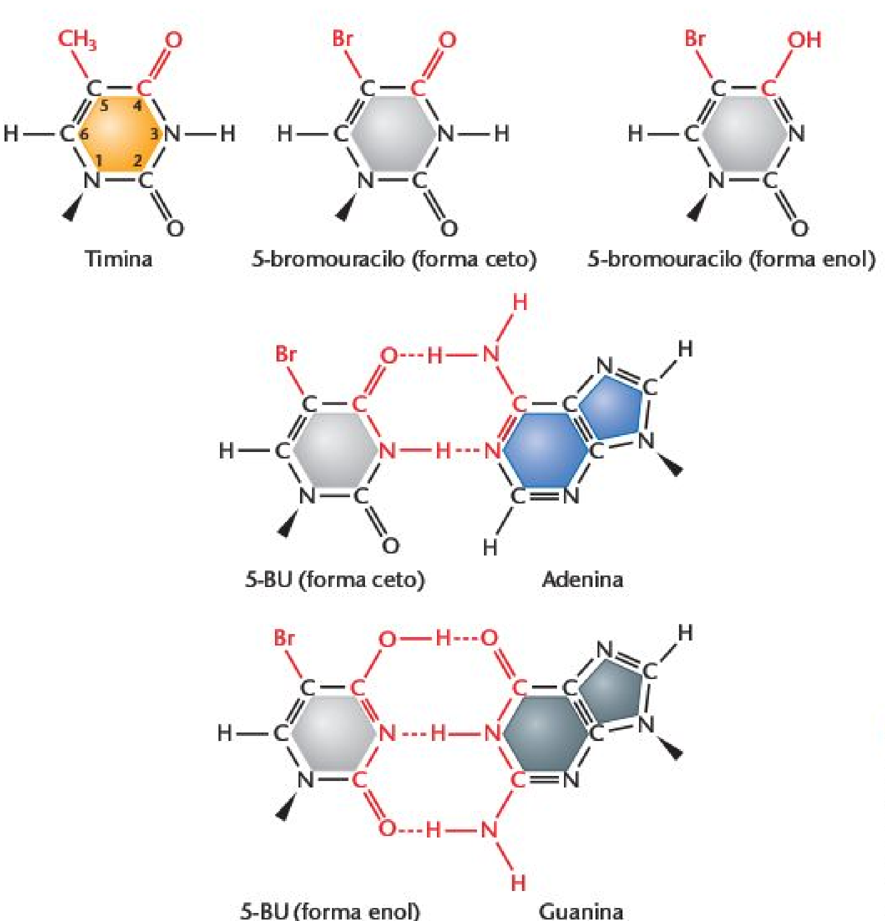


FIGURA 15.5 Parecido entre la estructura del 5-bromouracilo (5-BU) y la estructura de la timina. En la forma ceto más común, la 5-BU se empareja con la adenina, comportándose como un análogo. En la forma enol menos frecuente, se empareja de manera anómala con la guanina.

timidina y si se produce un cambio tautomérico a la forma enol, la 5-BU se emparejará con la guanina. Después de una ronda de replicación, se habrá producido una mutación de transición de A═T a G≡C. Además, la presencia de 5-BU en el DNA incrementa la sensibilidad de la molécula a la luz ultravioleta (UV), que es también mutagénica, como se discute a continuación.

Hay otros análogos de bases que también son mutagénicos. Por ejemplo, la **2-amino purina (2-AP)** puede actuar como análoga de la adenina. Además de su afinidad de emparejamiento con la timina, la 2-AP también puede emparejarse con la citosina, lo que tras la replicación conduce a la posible transición de A═T a G≡C.

Agentes alquilantes

Uno de los primeros grupos de mutágenos químicos descubiertos fueron los **gases mostaza**, que contienen sulfuro. El descubrimiento se realizó durante la I Guerra Mundial, en investigaciones sobre armas químicas. Los gases mostaza son **agentes alquilantes**; es decir, ceden grupos alquilo como CH_3 o CH_3—CH_2 a grupos amino o ceto de los nucleótidos. Por ejemplo, el **etilmetanosulfonato (EMS)** alquila los grupos ceto de las posiciones 6 de la guanina y 4 de la timina. Como sucede con los análogos de bases, las afinidades de emparejamiento se alteran provocando mutaciones de transición. Por ejemplo, la **6-etilguanina** es una base análoga de la adenina, y se empareja con la timina (Figura 15.6). La Tabla 15.3 enumera los nombres químicos y las estructuras de diversos agentes alquilantes mutagénicos de frecuente utilización.

Colorantes de acridina y mutaciones de cambio de fase

Los mutágenos químicos denominados colorantes de acridina causan mutaciones de cambio de fase. Como se muestra en la Figura 15.1, las mutaciones de cambio de fase se producen por la adición o la deleción de uno a más pares de bases en la secuencia polinucleotídica de un gen. En la Figura 15.7 se muestran las estructuras de la **proflavina**, el mutágeno de acridina más ampliamente investigado, y del **naranja de acridina**. Los colorantes de acridina tienen aproximadamente las mismas dimensiones que un par de bases nitrogenadas, y se **intercalan** o se encajan entre las purinas y las pirimidinas de un DNA intacto. Su intercalación provoca contorsiones en la hélice de DNA, causando deleciones y adiciones que generan mutaciones de cambio de fase.

Un modelo sugiere que la mutación de cambio de fase resultante se genera en huecos producidos en el DNA durante su replicación, reparación, o recombinación. Durante estos sucesos, existe la posibilidad de que una cadena se desplace respecto a la otra y de que se produzcan emparejamientos de bases impropios entre las cadenas. El modelo sugiere que la intercalación de la acridina en una región impropiamente emparejada pueda incrementar la presencia de estas estructuras desplazadas. Así, incrementa la posibilidad de que la configuración mal

TABLA 15.3 AGENTES ALQUILANTES

Nombre común o símbolo	Nombre químico	Estructura química
Gas mostaza (sulfuro)	Di-(2-cloroetil) sulfito	$Cl-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-Cl$
EMS	Etilmetano sulfonato	$CH_3-CH_2-O-S(=O)_2-CH_3$
EES	Etiletano sulfonato	$CH_3-CH_2-O-S(=O)_2-CH_2-CH_3$

FIGURA 15.6 Conversión de guanina en 6-etilguanina por el agente alquilante etilmetanosulfonato (EMS). La 6-metilguanina se empareja con la timina.

Proflavina

Naranja de acridina

FIGURA 15.7 Estructura química de la proflavina y del naranja de acridina, que se intercalan en el DNA causando mutaciones de cambio de fase.

emparejada exista cuando se produzca la síntesis y la unión de las cadenas, resultando en la adición o deleción de una o más bases en una de las dos cadenas.

Radiación ultravioleta y dímeros de timina

Toda la energía de la Tierra consiste en una serie de componentes electromagnéticos de longitud de onda variable (Figura 15.8). La energía asociada a estos diversos componentes varía inversamente con su longitud de onda, denominada **espectro electromagnético.** Cualquier longitud de onda que sea mayor o igual a la de la luz visible es benigna cuando interacciona con la mayor parte de moléculas orgánicas. Sin embargo, cualquier longitud de onda que sea menor que la de la luz visible, que es inherentemente más energética, tiene un efecto perjudicial sobre las moléculas orgánicas, incluyendo las que forman los tejidos vivos. Por ejemplo, en el Capítulo 10 subrayamos el hecho de que las purinas y las pirimidinas absorben **radiación ultravioleta** (**UV**) con mayor intensidad a una de longitud de onda de 260 nm, una propiedad que es útil para detectar y analizar los ácidos nucleicos. En 1934, como consecuencia de investigaciones en huevos de *Drosophila*, se descubrió que la radiación UV es mutagénica. El efecto más importante de la radiación UV es la formación de **dímeros de pirimidina**, especialmente entre dos residuos de timina (Figura 15.9). Aunque también se pueden forman dímeros citosina-citosina y timina-citosina, éstos son minoritarios respecto a los dímeros de timidina. Los dímeros distorsionan la conformación del DNA e inhiben la replicación normal. El resultado es que se pueden introducir errores en la secuencia de bases del DNA durante la replicación. Cuando la dimerización inducida por UV es extensa, es responsable (al menos en parte), de los efectos letales de la radiación UV sobre las células.

Como veremos posteriormente, han evolucionado diversos mecanismos para corregir las lesiones inducidas por luz UV. Ilustraremos la naturaleza básica de estos mecanismos de reparación en los humanos discutiendo la enfermedad hereditaria xeroderma pigmentosum, en la que está mutado alguno de los siete genes diferentes que controlan la reparación del DNA. Se dice que las personas con esta condición genética son «niños de la noche», ya que no pueden exponerse al componente ultravioleta de la luz solar sin arriesgarse a sufrir tumores epidérmicos malignos.

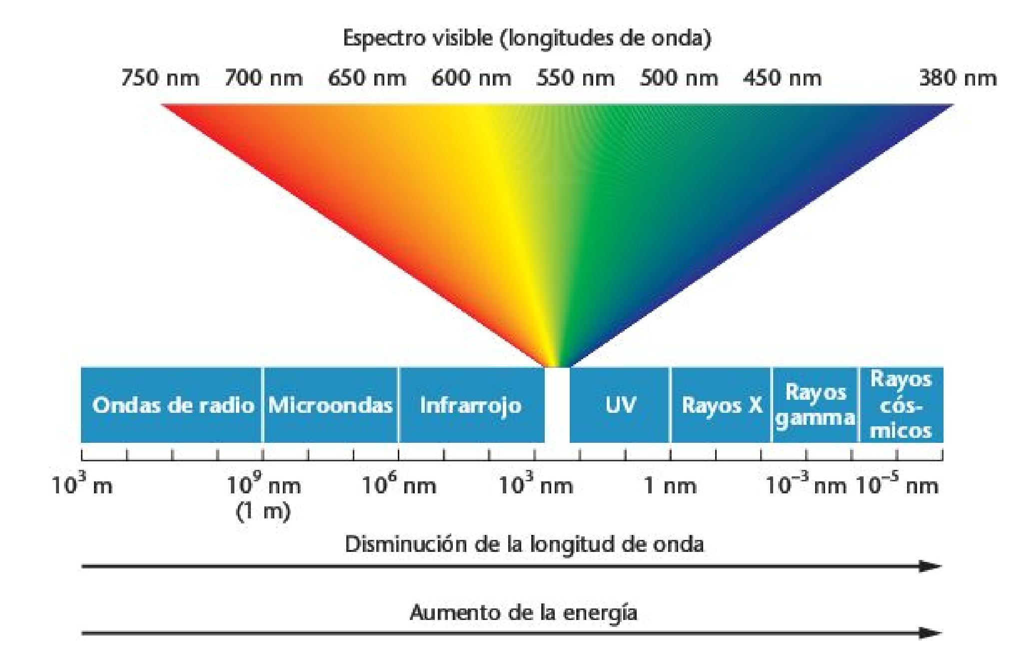
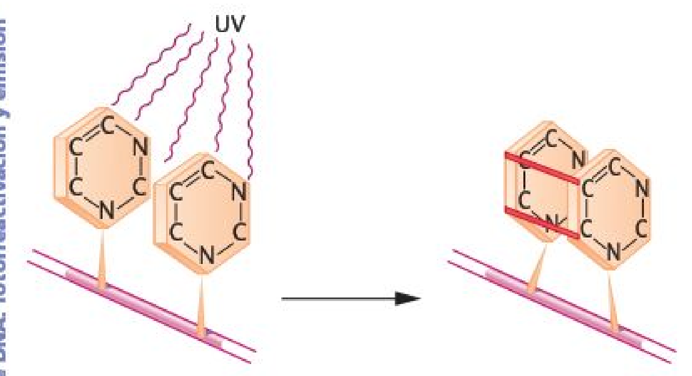


FIGURA 15.8 Componentes del espectro electromagnético y sus longitudes de onda asociadas.

Seminario Web 15.2
Reparación de DNA: fotorreactivación y emisión



Dímero formado entre residuos de timidina adyacentes en una cadena de DNA

FIGURA 15.9 Inducción de un dímero de timina por radiación UV, que conduce a una distorsión del DNA. Los enlaces covalentes se producen entro los átomos del anillo de pirimidina.

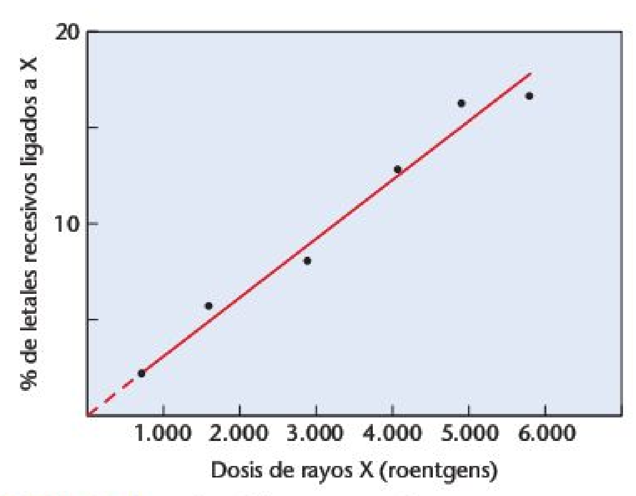


FIGURA 15.10 Gráfica del porcentaje de mutaciones recesivas ligadas a X inducidas por dosis crecientes de rayos X. Si se extrapola, la línea intersecciona con el centro del eje de coordenadas, como muestra la línea discontinua.

Radiación ionizante

En el espectro electromagnético, la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda. Como se muestra en la Figura 15.8, los **rayos X**, los **rayos gamma** y los **rayos cósmicos** tienen una longitud de onda incluso menor que la radiación UV, y por lo tanto son más energéticos que ésta. En consecuencia, penetran más profundamente en los tejidos, provocando la ionización de las moléculas que encuentran en su camino. Estas fuentes de **radiación ionizante** son mutagénicas, como establecieron Herman J. Muller y Lewis J. Stadler en la década de 1920. Desde entonces, se han estudiado profundamente los efectos de la radiación ionizante, especialmente de los rayos X.

Al penetrar los rayos X en las células, se expulsan electrones de los átomos de las moléculas que la radiación encuentra. De este modo, las moléculas y los átomos estables se transforman en radicales libres y en iones reactivos. A lo largo del camino seguido por el rayo de energía queda una estela de iones que puede iniciar diversas reacciones químicas. Estas reacciones pueden afectar directa o indirectamente al material genético, alterando las purinas y las pirimidinas del DNA y dando lugar a mutaciones puntuales. Estas radiaciones ionizantes también pueden romper los enlaces fosfodiéster, interrumpiendo la integridad del cromosoma, dando lugar a diversas aberraciones cromosómicas, como deleciones, translocaciones y fragmentación cromosómica.

La Figura 15.10 muestra una gráfica de mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X comparadas con la dosis de rayos X administrada. Hay una relación lineal entre la dosis de rayos X y la inducción de mutaciones; cada vez que se dobla la dosis, se inducen el doble de mutaciones. Como la línea intersecciona cerca del cero del eje, la gráfica sugiere que incluso dosis muy pequeñas de radiación son mutagénicas.

Ahora resuelva esto

El Problema 15.23 de la página 448 le pide que describa las maneras por las que el medicamento quimioterapéutico melfalan mata las células cancerosas, y cómo estas células pueden reparar el daño del DNA causado por este medicamento.

Sugerencia: Para responder a esta pregunta, repase cómo los agentes alquilantes alteran las bases del DNA. Piense en cómo los cambios en el emparejamiento de bases conducen a mutaciones, y en los efectos que las mutaciones tienen en las células en replicación. En la Sección 15.8 se trata cómo las células reparan el tipo de mutaciones introducidas por los agentes alquilantes.

15.5 La genómica y la secuenciación génica han incrementado nuestra comprensión de las mutaciones en los humanos

Hasta este momento hemos tratado las bases moleculares de la mutación casi exclusivamente en términos de la química de los ácidos nucleicos. Históricamente, los científicos aprendieron sobre las mutaciones analizando las secuencias aminoacídicas de proteínas en poblaciones que muestran una diversidad sustancial. Esta diversidad, que surge durante la evolución, es un reflejo de los cambios en los tripletes codificantes que se producen tras la sustitución, la inserción o la deleción de uno o más nucleótidos en la secuencia de DNA de los genes que codifican proteínas.

Al incrementar la capacidad de analizar el DNA de manera más directa, podemos examinar la secuencia real de nucleóti-

dos de los genes y obtener más datos sobre la naturaleza de las mutaciones. La utilización de diversas técnicas que permiten secuenciar el DNA de manera rápida y precisa (véase el Capítulo 19) ha permitido incrementar enormemente nuestro conocimiento de las mutaciones. En esta sección se examinan los resultados de diversos estudios que han investigado las secuencias reales de varias mutaciones de genes que afectan la salud humana.

Los tipos sanguíneos ABO

El sistema ABO se basa en un conjunto de determinantes antigénicos que se encuentran en los eritrocitos y en otras células, especialmente en las de tipo epitelial. Como se discutió en el Capítulo 4, existen tres alelos para un solo gen que codifica la enzima glicosiltransferasa. La sustancia H se modifica en el antígeno A o en el B, como resultado del producto del alelo I^A o I^B, respectivamente. La no modificación de la sustancia H es el resultado del alelo I^O. (Véase la Figura 4.2.)

Se ha secuenciado el gen de la glicosiltransferasa en 14 personas con diferente condición ABO. Al comparar el DNA de los alelos I^A e I^B, se encontraron cuatro sustituciones nucleotídicas congruentes. Se supone que los cambios en la secuencia de aminoácidos del producto del gen de la glucosiltransferasa conducen a las diferentes modificaciones de la sustancia H.

La situación del alelo I^O es especial e interesante. Los individuos homocigotos para este alelo son del tipo O, no tienen actividad glucosiltransferasa y no pueden modificar la sustancia H. El análisis del DNA de este alelo muestra un cambio congruente que es especial, comparado con la secuencia de los otros alelos: la deleción de un único nucleótido al inicio de la secuencia codificante, que provoca una mutación de cambio de fase. Se transcribe un RNA mensajero completo pero, durante la traducción, la fase de lectura cambia justo en el punto de la deleción, continúa fuera de fase durante 100 nucleótidos y se encuentra con un codón de terminación. Esto produce la terminación prematura de la cadena polipeptídica, obteniéndose un producto que no es funcional.

Estos resultados proporcionan una explicación molecular directa del sistema alélico ABO y de la base para la biosíntesis de los correspondientes antígenos. La base molecular para estos fenotipos antigénicos es el resultado de las mutaciones en el gen que codifica la enzima glucosiltransferasa.

La distrofia muscular

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades genéticas que se caracterizan por debilidad y degeneración muscular progresiva. Hay muchos tipos de distrofia muscular que difieren en su gravedad, en su inicio y en las causas genéticas. Hay dos formas relacionadas de distrofia muscular, la **distrofia muscular de Duchenne (DMD)** y la **distrofia muscular de Becker (BMD)**, que son recesivas y ligadas a X. La DMD es la más grave de ellas, con una progresión rápida de la degeneración muscular que implica también el corazón y los pulmones. Normalmente, los varones con DMD pierden la capacidad de andar a los 12 años y pueden morir poco después de cumplir los 20 años. Puesto que es un carácter recesivo y ligado a X, y normalmente los varones afectados mueren antes de reproducirse, las mujeres no suelen estar afectadas por esta enfermedad. Su incidencia, que es de 1/5.000 nacimientos de varones, la convierte en la enfermedad hereditaria conocida más común de las que reducen la esperanza de vida. En cambio, la BMD no implica al corazón ni a los pulmones y progresa lentamente, desde la adolescencia hasta los 50 años o más.

El gen responsable de la DMD y de la BMD, el gen de la *distrofina*, es anormalmente largo, de unos 2,5 millones de pares de bases. En los individuos sanos (no afectados), la transcripción y el procesamiento posterior del transcrito *distrofina* inicial producen un RNA mensajero formado por solo 14.000 bases (14kb), que se traduce en la proteína **distrofina**, que tiene 3.685 aminoácidos. Esta proteína puede detectarse, en los casos más leves de BMD, en el sarcolema de las miofibrillas lisas, estriadas y cardíacas. Sin embargo, raramente se encuentra en los músculos de pacientes con DMD. Esto ha conducido a la hipótesis de que la mayoría de mutaciones que causan la BMD no alteran la fase de lectura, mientras que la mayoría de mutaciones de la DMD cambian la fase de lectura al inicio del gen, provocando la terminación prematura de la traducción de la distrofina. Esta hipótesis es congruente con las diferencias observadas en la gravedad de estas dos formas de la enfermedad.

En un análisis extensivo realizado en 1989, J. T. Den Dunnen y sus colaboradores analizaron el DNA de 194 pacientes (160 afectados de DMD y 34 de BMD). En la mayor parte de los casos, los resultados fueron congruentes con la hipótesis de la «fase de lectura». Salvo unas pocas excepciones, las mutaciones DMD cambian la fase de lectura del gen de la distrofina, mientras que las mutaciones BMD no suelen cambiarla. El descubrimiento más notable es, quizás, el alto porcentaje de mutaciones deletéreas examinadas que consisten en la deleción o inserción de nucleótidos en el gen. Estudios posteriores han mostrado que aproximadamente dos tercios de las mutaciones en el gen de la distrofina que conducen a DMD o a BMD son deleciones o duplicaciones. Sólo un tercio son mutaciones puntuales, y la mayoría de ellas son pequeñas inserciones y deleciones. La mayor parte de mutaciones DMD, tanto las reorganizaciones como las mutaciones puntuales, conducen a la terminación prematura de la traducción. A su vez, esto conduce a la degradación del transcrito de distrofina inadecuadamente traducido y a niveles bajos de la proteína distrofina. En cambio, la mayor parte de las reorganizaciones génicas y de las mutaciones puntuales del BMD pueden alterar la secuencia interna del transcrito de la distrofina y de su proteína, pero no alteran la fase de lectura de la traducción.

Esta observación refleja el hecho de que una mutación causada por la sustitución aleatoria de un nucleótido es más fácil de tolerar, sin que produzca los efectos fenotípicos devastadores de la adición o la pérdida de nucleótidos, que pueden alterar la fase de lectura de la traducción. Hay tres razones para ello:

1. La sustitución de un nucleótido no cambia necesariamente el aminoácido codificado ya que el código es degenerado.
2. Si se produce el cambio de un aminoácido, éste puede producirse en una parte de la proteína que no sea esencial para su función.
3. Incluso si el cambio se produce en una región esencial de la proteína, puede que su efecto sobre la función de la proteína sea mínimo o puede no tener ningún efecto. Por ejemplo, un aminoácido podría cambiar por otro con propiedades químicas casi idénticas o por uno con propiedades físicas muy similares, como la forma.

Repeticiones de trinucleótidos en el síndrome del X frágil, en la distrofia miotónica y en la enfermedad de Huntington

El análisis molecular del DNA de los genes responsables de diversas enfermedades hereditarias en la especie humana, que empezó hacia 1990, ha proporcionado importantes observaciones. Los investigadores han descubierto que algunos genes mutantes contienen expansiones de **secuencias repetidas de trinucleótidos**, generalmente de menos de 15 copias en los individuos normales a grandes cantidades en los afectados.

Por ejemplo, los genes responsables del síndrome de X frágil, que está ligado a X, y de las enfermedades autosómicas de la distrofia miotónica y de la enfermedad de Huntington contienen una secuencia de DNA de tres nucleótidos repetida muchas veces. Aunque este tipo de secuencias repetidas también está presente en el alelo normal (no mutante) de cada gen, la mutación que se encuentra en las personas afectadas de estas enfermedades consiste en un incremento significativo del número de veces que se repite el trinucleótido. En la Tabla 15.4 se resumen los casos que se discuten en esta sección, enfatizando especialmente el tamaño de las repeticiones en las personas normales y en las afectadas.

En el Capítulo 4 se discutió el inicio de la expresión de diversos fenotipos. En varios casos se ha encontrado una correlación entre el número de repeticiones y la edad de manifestación de los fenotipos mutantes. Cuanto mayor es el número de repeticiones, antes se inicia la enfermedad. Además, en los individuos afectados el número de repeticiones puede incrementar en cada generación. Este fenómeno general se denomina **anticipación genética**.

Empezaremos discutiendo brevemente el **síndrome de X frágil**, descrito en el Capítulo 8. El gen responsable, conocido como *FMR-1*, puede contener entre varios cientos y varios millares de copias de la secuencia trinucleotídica CGG, localizada en la región 5′ no traducida del gen. Los individuos con hasta 54 copias son normales y no manifiestan el retraso mental asociado a este síndrome. Los individuos con 54 a 230 copias se consideran portadores. Aunque son normales, sus descendientes pueden tener todavía más copias y expresar el síndrome. Las grandes regiones de repeticiones CGG en la región reguladora del gen provocan la pérdida de expresión de la proteína FMRP, que se cree que es una proteína de unión a RNA que afecta la función de las células del cerebro.

La **distrofia miotónica**, o DM, es la forma más común de distrofia muscular en adultos, y afecta a 1 de cada 8000 personas. Esta enfermedad hereditaria dominante no es tan grave como la DMD, y sus síntomas y la edad de aparición son muy variables. Los síntomas más comunes son ligera miotonía de la musculatura de la cara y las extremidades (atrofia y debilidad). Otros síntomas de este síndrome son cataratas, retraso mental y tumores cutáneos e intestinales.

El gen afectado, *MDPK*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 19. Codifica una serina-treonina proteína quinasa, MDPK. Esta proteína es el producto de los 15 exones del gen, el último de los cuales codifica la secuencia 3′ no traducida del mRNA. Esta secuencia alberga múltiples copias del trinucleótido CTG. Las personas que presentan entre 5 y 37 copias de la repetición CTG son normales, y este número de copias es estable de una generación a la siguiente. Las personas que tienen más de 37 copias presentan los síntomas de la enfermedad, que van de suaves a graves, y la edad de aparición está comprendida entre el nacimiento y los 60 años. Tanto la gravedad como el inicio de la enfermedad están directamente relacionados con tamaño de la secuencia repetida. Los pacientes con los síntomas más suaves tienen hasta 150 copias, mientras que los casos más graves presentan hasta 1500 copias del triplete CTG. Los descendientes muestran anticipación genética. Todavía se desconoce el mecanismo por el que estas regiones con repeticiones causan la DM.

La **enfermedad de Huntington** (HD) es una enfermedad neurodegenerativa mortal que se hereda de forma autosómica dominante. (Véase también el Capítulo 4.) El gen responsable de HD se encuentra en el Cromosoma 4. Este gen contiene la secuencia trinucleotídica CAG, que se encuentra repetida entre

TABLA 15.4 **RESUMEN DE LAS ENFERMEDADES DE TRINUCLEÓTIDOS REPETIDOS**

	Trinucleótido repetido	Número en personas normales	Número en individuos afectos
Enfermedad de Huntington	CAG	6-35	36-120
Distrofia miotónica	CTG	5-37	37-1.500
Síndrome de X frágil	CGG	6-230	>230
Atrofia muscular espinolobular	CAG	10-35	35-60

10 y 35 veces en las personas normales. La repetición CAG se encuentra en la región codificante del gen, y codifica un trecho de poliglutamina. Las personas enfermas presentan un incremento significativo del número de repeticiones CAG (hasta 120). La edad de inicio es mucho más temprana cuando el número de copias es cercano al límite superior. Es interesante observar que en otra enfermedad, la **atrofia muscular espinolobular** (o enfermedad de Kennedy), el gen responsable (que es diferente al que causa la enfermedad de Huntington) contiene copias repetidas del mismo triplete CAG. Sin embargo, la sola presencia de 35 a 60 copias de esta secuencia es suficiente para que los afectados manifiesten la enfermedad.

Se desconoce la función de estas secuencias repetidas tanto en los genes normales como en los mutantes. Su localización dentro del gen varía en cada caso. En las enfermedades de Huntington y de Kennedy la repetición está en la región codificante del gen. En el caso de la enfermedad de Huntington, estas repeticiones hacen que la proteína mutante **huntingtina** contenga un exceso de residuos glutamina. Sin embargo, en las otras dos enfermedades no sucede de la misma manera. En el gen responsable del síndrome de X frágil, la repetición está corriente arriba (en el extremo 5′) de la región codificante, en el área que suele estar implicada en la regulación de la expresión génica. En el caso de la distrofia miotónica, la repetición está corriente abajo (en el extremo 3′).

El mecanismo por el que la secuencia se expande de generación en generación también presenta un gran interés. Actualmente se cree que puede ser el resultado de errores ocurridos durante la replicación, así como también de errores de los mecanismos de reparación del DNA dañado. Sea cual fuere la causa, la inestabilidad general de estas repeticiones cortas parece ser más común en humanos que en otros muchos organismos.

Ahora resuelva esto

El Problema 15.24 de la página 449 le pide que especule sobre por qué el gen de la *distrofina* parece sufrir un gran número de mutaciones.

Sugerencia: Cuando responda esta pregunta, debería pensar en la estructura y la función de este gen. Considere qué características de la estructura del gen de la distrofina pueden hacerlo susceptible de acumular tantas mutaciones.

15.6 Para detectar mutaciones se utilizan técnicas genéticas, cultivos celulares y análisis de genealogías

Antes de que los genéticos pudiesen estudiar directamente el proceso de mutación, o de que pudiesen obtener organismos mutantes para las investigaciones en genética, tenían que ser capaces de detectar las mutaciones. La facilidad y la eficiencia en la detección de mutaciones ha determinado, por norma general, la utilidad de los organismos para los estudios genéticos. En el Capítulo 21 se examinará cómo se usan *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* y ratón como organismos modelo en el análisis genético. En esta sección examinaremos brevemente otros diversos ejemplos para ilustrar cómo se detectan las mutaciones.

Detección en bacterias y en hongos

La detección de mutaciones es más eficiente en microorganismos haploides, como las bacterias y los hongos. A menudo la detección depende de un sistema de selección en el que las células mutantes puedan aislarse fácilmente de las no mutantes. Los principios generales son parecidos en bacterias y en hongos. Como ejemplo, describiremos como se detectan mutaciones nutricionales en el hongo *Neurospora crassa*.

Neurospora es un moho rosado que suele crecer en el pan, y que también puede cultivarse en el laboratorio. Este moho eucariótico es haploide durante la fase vegetativa de su ciclo biológico. De esta manera, las mutaciones pueden detectarse sin las complicaciones generadas por la heterocigosidad de los organismos diploides.

Neurospora silvestre crece en un **medio de cultivo mínimo** con glucosa, unas cuantas sales y ácidos inorgánicos, una fuente de nitrógeno como el nitrato de amonio, y la vitamina biotina. Los mutantes nutricionales inducidos no crecerán en el medio mínimo, pero lo harán en un **medio completo** o suplementado que contenga también numerosos aminoácidos, vitaminas, derivados de los ácidos nucleicos, etcétera. Los microorganismos silvestres desde el punto de vista nutricional (que precisan sólo medio mínimo) se denominan **protótrofos**, mientras que aquellos mutantes que precisan un suplemento específico añadido al medio mínimo se denominan **auxótrofos**.

Los mutantes nutricionales pueden detectarse y aislarse por su incapacidad de crecer en medio mínimo y por su capacidad de crecer en medio completo. Las células mutantes no pueden sintetizar alguna sustancia esencial ausente en el medio mínimo, pero que está presente en el medio completo. Una vez se ha detectado y aislado un mutante nutricional, se puede determinar qué sustancia es la que no puede sintetizar cultivando la cepa mutante en una serie de tubos que contengan medio mínimo suplementado con un único compuesto. De esta manera se puede definir la mutación auxotrófica. Beadle y Tatum utilizaron esta técnica de detección durante sus estudios de «un gen:una enzima».

Detección en plantas

La variación genética en plantas es amplia. Los guisantes de Mendel fueron la base del descubrimiento de los postulados fundamentales de la genética de la transmisión, y estudios posteriores en plantas han incrementado el conocimiento de la interacción génica, de la herencia poligénica, del ligamiento, de

las reorganizaciones cromosómicas, y de la poliploidía. Muchas de las variaciones se detectan a simple vista, pero también hay técnicas para detectar mutaciones bioquímicas en plantas.

Una de las técnicas implica el análisis de la composición bioquímica de las plantas. Por ejemplo, el análisis bioquímico de la cepa mutante de maíz *opaque-2* condujo al descubrimiento de su alto contenido en lisina. Este análisis implicó el aislamiento de proteínas del endospermo de maíz, su hidrólisis y la determinación de su composición aminoacídica. Puesto que el contenido en lisina de las proteínas de maíz es bajo, esta mutación mejora significativamente el valor nutricional de esta planta. Como consecuencia de este descubrimiento, los genéticos de plantas y los demás especialistas han analizado la composición de aminoácidos de diferentes cepas de otras gramíneas, como el arroz, el trigo, la cebada y el mijo. Los resultados de estos análisis son útiles para combatir las enfermedades de malnutrición como consecuencia de dietas con proteínas inapropiadas o con falta de algún aminoácido esencial.

Otra técnica de detección implica el cultivo tisular de líneas celulares de plantas en medios definidos. Las células vegetales se manipulan como si fuesen microorganismos, pudiéndose determinar la resistencia a herbicidas o a toxinas de enfermedades añadiendo estas sustancias al medio de cultivo. Las técnicas asociadas a mutantes letales condicionales pueden utilizarse en cultivos tisulares y después pueden aplicarse a la genética de las plantas superiores, lo que proporciona un sistema de detección que normalmente no es posible en plantas intactas.

Detección en la especie humana

Puesto que la especie humana no es, por motivos obvios, un organismo de experimentación adecuado, las técnicas desarrolladas para la detección de mutaciones en organismos como bacterias y plantas no están disponibles para los genéticos humanos. Para determinar la base mutacional de cualquier característica o enfermedad humana, los genéticos deben analizar, en primer lugar, el árbol genealógico que remonte la historia de la familia tanto como sea posible. Si se ve que el carácter es hereditario, el árbol genealógico puede ser útil para determinar si el alelo mutante se comporta como dominante o recesivo, y si está ligado al cromosoma X o es autosómico.

Las mutaciones dominantes son las más sencillas de detectar. Si están en el cromosoma X, los padres afectados pasan la característica fenotípica a todas sus hijas. Si la mutación es autosómica dominante, aproximadamente el 50 por ciento de los descendientes de un individuo heterocigoto afectado mostrarán el carácter. La Figura 15.11 muestra un árbol genealógico que ilustra la aparición de un alelo autosómico dominante de cataractas en el ojo. Los padres en la Generación I no estaban afectados, pero uno de sus tres hijos (Generación II) desarrolló cataratas, por lo que la mutación original se produjo con toda probabilidad en uno de los gametos de sus padres. La mujer afectada, la probando, tiene dos hijos, de los que el varón está afectado (Generación III). De sus seis descendientes, cuatro están afectados (Generación IV). Estas observaciones son congruentes con un modelo de herencia autosómica dominante, aunque no lo demuestran. Sin embargo, el elevado porcentaje de descendientes en la Generación IV favorece esta conclusión. La presencia de una hija no afectada en esta generación contradice que el alelo mutante esté ligado al cromosoma X, ya que ella recibió uno de los cromosomas X de su padre, que está afectado. Así, si el alelo mutante presenta penetración completa, esta conclusión es sólida.

Las mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X también pueden detectarse mediante el análisis de árboles genealógicos, como se expuso en el Capítulo 4. El caso más famoso de una mutación ligada al cromosoma X en humanos es el de la **hemofilia**, que se encontró en los descendientes de la Reina Victoria de Inglaterra. El análisis del árbol genealógico (Figura 15.12) deja pocas dudas del hecho de que Victoria era heterocigótica (*Hh*) para este carácter. Su padre no estaba afectado, y no hay ninguna razón para pensar que la madre fuese portadora, como lo era Victoria. La mutación recesiva de la hemofilia se ha producido muchas veces en las poblaciones humanas, pero las consecuencias políticas de la mutación surgida en la familia real Británica han sido enormes. Dos de las hijas de la reina Victoria eran portadoras, y pasaron la hemofilia a las familias reales Rusa y Española. Es posible que los intentos de la zarina Alexandra de hacer más llevadera la hemofilia de su hijo tuviesen por consecuencia la presencia de Rasputín en la corte real, y podrían haber contribuido al estallido de la revolución rusa.

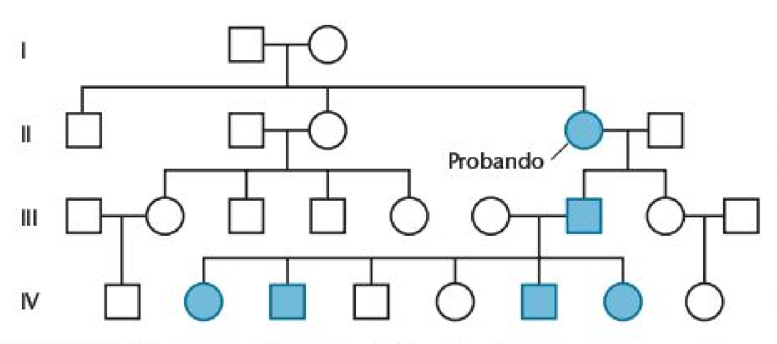




FIGURA 15.11 Árbol genealógico hipotético de cataratas oculares en humanos.

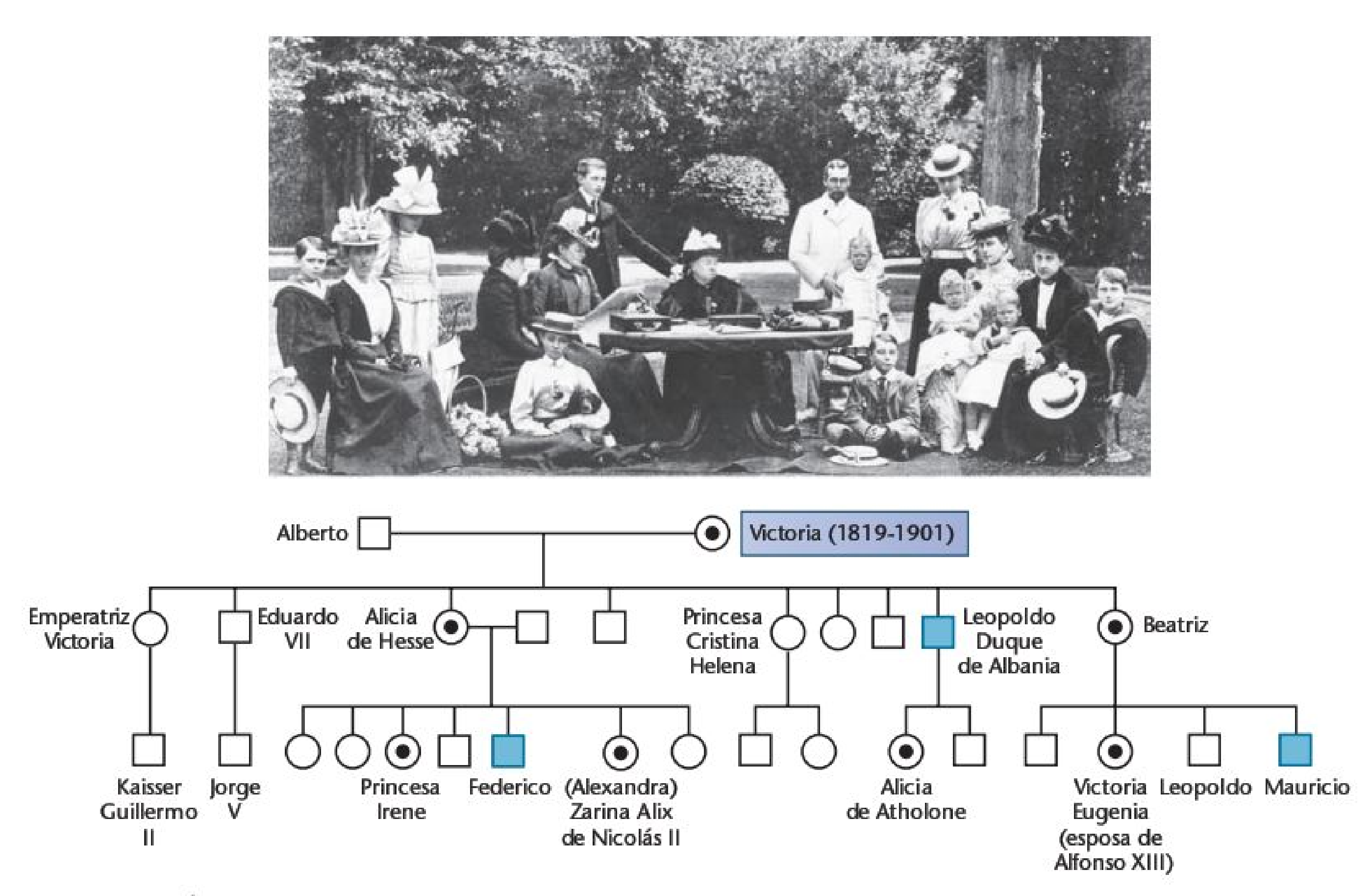


FIGURA 15.12 Árbol genealógico parcial de la hemofilia en la familia real británica descendiente de la Reina Victoria. El árbol genealógico es el típico de la transmisión de caracteres recesivos ligados a X. Los círculos con un punto indican las mujeres presuntamente heterozigotas portadoras de este carácter. La fotografía muestra a la Reina Victoria (sentada ante la mesa, en el centro) y algunos de sus familiares próximos.

Es posible detectar alelos autosómicos recesivos de manera similar. Debido a que este tipo de mutación se «esconde» cuando se encuentra en heterocigosis, no es extraño que el carácter sólo aparezca intermitentemente en varias generaciones. El apareamiento entre un individuo afectado y un individuo normal homocigoto producirá descendientes no afectados heterocigotos portadores. El apareamiento entre dos portadores producirá, como promedio, un cuarto de descendientes afectados.

Además del análisis de árboles genealógicos, actualmente las células humanas pueden cultivarse *in vitro* de manera rutinaria. Este procedimiento ha permitido detectar muchas más mutaciones que cualquier otra forma de análisis. Técnicas como el análisis de la actividad enzimática, la migración de las proteínas en campos electroforéticos, y la secuenciación de DNA y de proteínas han permitido identificar mutaciones y demostrar una amplia variación genética entre individuos en las poblaciones humanas. Como veremos posteriormente en este capítulo, los estudios iniciales de la enfermedad humana xeroderma pigmentosum se basaron en la técnica de cultivos celulares *in vitro*.

Más recientemente, la genómica y las técnicas de genética reversa han incrementado el número de técnicas disponibles para que los genéticos estudien las mutaciones humanas. En el Capítulo 21 se describen algunos de estos métodos.

Ahora resuelva esto

El Problema 15.26 de la página 449 le pide que explique cómo puede haber surgido la hemofilia ligada al cromosoma X en la familia real británica.

Sugerencia: Para responder a esta pregunta, debería considerar la manera cómo se producen las mutaciones, en qué tipo de células pueden producirse y cómo se heredan.

15.7 El ensayo de Ames se usa para valorar la mutagenicidad de los compuestos químicos

Existe una gran preocupación sobre las posibles propiedades mutagénicas de cualquier sustancia que entra en el cuerpo humano, ya sea por la piel, por el sistema digestivo, o por el apa-

rato respiratorio. Por ejemplo, se está prestando una gran atención a los materiales residuales de la contaminación del aire y del agua, a los conservantes y aditivos de los alimentos, a los edulcorantes artificiales, a los herbicidas, a los pesticidas y a los productos farmacéuticos. Como hemos visto, la mutagenicidad puede ensayarse en distintos organismos, como hongos, plantas y células de mamífero en cultivo. El ensayo más común, que se realiza en bacterias, fue diseñado por Bruce Ames.

El **ensayo de Ames** (Figura 15.13) utiliza cuatro cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* que han sido seleccionadas por su sensibilidad y especificidad a la mutagénesis. Por ejemplo, una cepa se utiliza para detectar sustituciones de pares de bases, y las otras tres detectan varias mutaciones de cambio de fase. Las cuatro cepas mutantes son incapaces de sintetizar histidina, y por lo tanto requieren histidina para crecer (his^-). El ensayo mide la frecuencia de reversión de la mutación, que produce bacterias silvestres (revertientes his^+). Estas cepas de *Salmonella* tienen una mayor sensibilidad a los mutágenos ya que contienen otras mutaciones que eliminan el sistema de reparación por escisión y la barrera de lipopolisacáridos que cubre y protege la superficie de la bacteria de la presencia de sustancias externas.

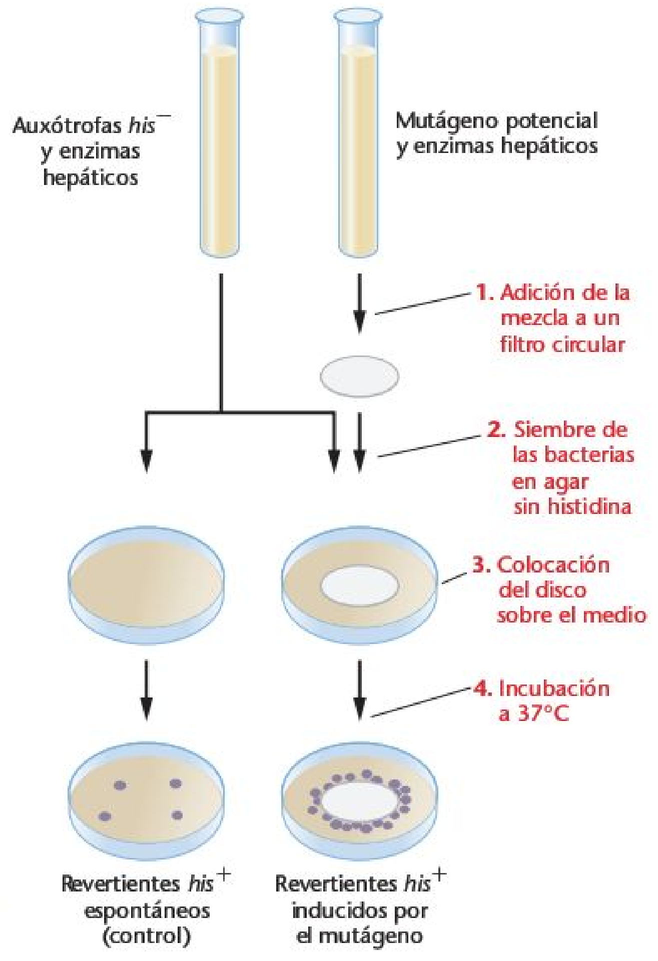


FIGURA 15.13 Ensayo de Ames, que analiza la mutagenicidad potencial de productos químicos.

Seminario Web 15.3 Mutagénesis química: ensayo de Ames

Es interesante destacar que muchas sustancias que entran en el cuerpo humano son relativamente inocuas hasta que se activan metabólicamente, generalmente en el hígado, en productos químicamente más activos. Así, el ensayo de Ames incluye un paso en el que el compuesto que se desea probar se incuba *in vitro* en presencia de un extracto de hígado de mamífero. Otra alternativa es inyectar los compuestos en ratones para que las enzimas de su hígado los modifiquen, y luego se recuperan para ser usados en el ensayo de Ames.

En la utilización inicial del ensayo de Ames, en la década de 1970, se examinó un elevado número de **carcinógenos** conocidos (agentes que causan cáncer), y se vio que más del 80 por ciento son potentes mutágenos. No es sorprendente, ya que la transformación de las células a un estado maligno se produce como resultado de alguna mutación. (Véase el Capítulo 18.) Aunque una respuesta positiva en el ensayo de Ames no demuestra que un compuesto sea carcinogénico, el ensayo de Ames es útil como mecanismo preliminar de rastreo. El ensayo de Ames se utiliza mucho en el desarrollo industrial y farmacéutico de sustancias químicas.

15.8 Los organismos utilizan sistemas de reparación del DNA para contrarrestar las mutaciones

Los seres vivos han generado por evolución diversos sistemas elaborados de reparación para contrarrestar muchos de los tipos de daño del DNA producidos por agentes internos y externos. La gran variedad y la compleja naturaleza de los sistemas de reparación del DNA son un testimonio de la vital importancia de esta reparación. Como se verá, estos sistemas de reparación son absolutamente necesarios para mantener la integridad genética de los organismos, y por lo tanto para la supervivencia de los organismos en la Tierra. Una de las principales preocupaciones de los humanos es la posibilidad de contrarrestar el daño genético que resulta en enfermedades genéticas y cáncer. En el Capítulo 18 de describe la relación entre una reparación del DNA defectuosa y la susceptibilidad al cáncer.

A continuación se repasan algunos de los sistemas de reparación del DNA. Puesto que este campo está creciendo constantemente, el objetivo de esta sección es estudiar las principales aproximaciones que utilizan los organismos para contrarrestar el daño genético.

Corrección de pruebas y reparación de emparejamientos erróneos

Algunos de los tipos de mutación más comunes del DNA surgen durante la replicación del DNA, cuando la DNA polimerasa inserta un nucleótido incorrecto. En bacterias, esta enzima (DNA polimerasa III) comete un error aproximadamente cada 100.000 inserciones, lo que significa una tasa de error de 10^{-5}. Afortunadamente, la enzima controla su propia síntesis reali-

zando una **corrección de pruebas** de cada paso, detectando el 99 por ciento de los errores. Cuando se inserta un nucleótido incorrecto durante la polimerización, la enzima tiene la capacidad de reconocerlo, de «invertir» el sentido de la marcha y de comportarse como una exonucleasa, cortando el nucleótido incorrecto y reemplazándolo por el adecuado. Esto mejora 100 veces la eficiencia de la replicación, generándose inmediatamente después de la replicación sólo $1/10^7$ emparejamientos erróneos, lo que representa una tasa final de error del 10^{-7}.

Para hacer frente a los errores que quedan después de la corrección de pruebas puede activarse otro mecanismo, denominado **reparación de emparejamientos erróneos**. Actualmente se conoce bien la base molecular de este proceso, propuesto hace más de 20 años por Robin Holliday. Igual que para la reparación de otras lesiones del DNA, debe detectarse la alteración o emparejamiento erróneo, debe eliminarse el nucleótido mal emparejado y el nucleótido incorrecto por el adecuado. Pero hay un problema especial con esta corrección. ¿Cómo puede reconocer el sistema de reparación qué cadena es la correcta (la cadena molde) y cuál contiene la base mal emparejada (la cadena recién sintetizada)? Si se reconociese el error pero no pudiese diferenciarse, la escisión sería aleatoria, y el 50 por ciento de las veces se cortaría la cadena que tuviese la base correcta. Por lo tanto, la discriminación de la cadena por la enzima de reparación es un paso esencial.

Este proceso de discriminación se ha dilucidado al menos en algunas bacterias, como en *E. coli.*, y se basa en el proceso de **metilación del DNA**. Estas bacterias contienen una enzima, la adenina metilasa, que reconoce la siguiente secuencia de DNA

5′ . . . GATC . . . 3′
3′ . . . CTAG . . . 5′.

como substrato durante la replicación del DNA, y añade un grupo metilo a cada uno de los residuos de adenina. Esta modificación es estable durante el ciclo celular.

Después de un ciclo de replicación, la cadena recién sintetizada permanece un tiempo sin metilar puesto que la metilasa va retrasada respecto a la DNA polimerasa. Es en este momento cuando la enzima de reparación reconoce el emparejamiento erróneo y se une preferencialmente a la cadena no metilada. Una enzima endonucleasa produce un corte ya sea a 5′ o a 3′ del emparejamiento erróneo en la cadena no metilada. Entonces se desenrolla la cadena de DNA cortada y una exonucleasa la degrada, hasta llegar a la región mal emparejada. Finalmente, la DNA polimerasa rellena el hueco generado por la exonucleasa, usando de molde la cadena correcta. Entonces la DNA ligasa sella el hueco.

Un grupo de productos génicos de *E. coli*, Mut H, L y S, están implicados en este proceso de reparación de emparejamientos erróneos. Mutaciones en cualquiera de ellos producen cepas bacterianas deficientes en la reparación de emparejamientos erróneos. Mut S reconoce el emparejamiento erróneo inicial y, de hecho, también puede reconocer pequeños lazos de inserción y de deleción generados durante la síntesis de DNA. Las proteínas Mut L y Mut H se alinean con la cadena que contiene la mutación y la cortan. Una exonucleasa digiere la región mal emparejada, la DNA polimerasa rellena el hueco, y finalmente la DNA ligasa lo sella. En bacterias, el proceso de reparación es extraordinariamente eficiente, reduciendo mil veces la tasa de error (el 99,9 por ciento de los emparejamientos erróneos se corrigen). Si bien este mecanismo se basa en estudios realizados en *E. coli*, en levaduras y en mamíferos existen mecanismos parecidos que implican proteínas homólogas.

Reparación postreplicativa y el sistema de reparación SOS

Se han descubierto otros muchos tipos de reparación, lo que ilustra la diversidad de mecanismos que han evolucionado para superar los daños producidos en el DNA. Uno de estos sistemas, denominado **reparación postreplicativa**, responde *después* de que el DNA dañado haya escapado a la reparación, y no se haya podido replicar completamente (de ahí su nombre). Como se esquematiza en la Figura 15.14, cuando se replica un DNA que contiene una lesión de cualquier tipo (como un dímero de pirimidina), la DNA polimerasa puede detenerse en la lesión y saltar por encima de ella, dejando un hueco en la cadena recién sintetizada. Para corregir el hueco, la proteína Rec A dirige un intercambio por recombinación con la región correspondiente de la cadena progenitora con la misma polaridad no dañada (la cadena «donante»). Cuando el segmento de DNA no dañado reemplaza el segmento dañado, el hueco se transfiere a la cadena donante. Este hueco puede rellenarse mediante síntesis reparativa al continuar la replicación. Puesto que en este tipo de reparación el DNA se produce un suceso de recombinación, la reparación postreplicativa también se denomina **reparación por recombinación homóloga**.

Hay otro sistema de reparación en *E. coli*, denominado **sistema de reparación SOS**, que también responde a los daños del DNA, pero lo hace de distinta manera. En presencia de emparejamientos erróneos y de huecos en el DNA producidos durante su replicación, las bacterias pueden inducir la expresión de unos 20 genes (entre los que se incluyen *lexA*, *recA* y *uvr*) cuyos productos permiten que se produzca la replicación del DNA incluso en presencia de estas lesiones. Como que este tipo de reparación es el último recurso para el DNA dañado, también se conoce como reparación SOS. Durante la reparación SOS, la síntesis de DNA se convierte en propensa a los errores, insertando nucleótidos posiblemente incorrectos de manera aleatoria en sitios en los que normalmente la replicación se detendría. En consecuencia, la reparación SOS es mutagénica en si misma, aunque puede permitir que la célula sobreviva a daños en el DNA que de otra forma la matarían.

Reparación por fotorreactivación: reversión del daño por UV en procariotas

Como se muestra en la Figura 15.9, la luz UV es mutagénica como resultado de la formación de dímeros de pirimidina. El

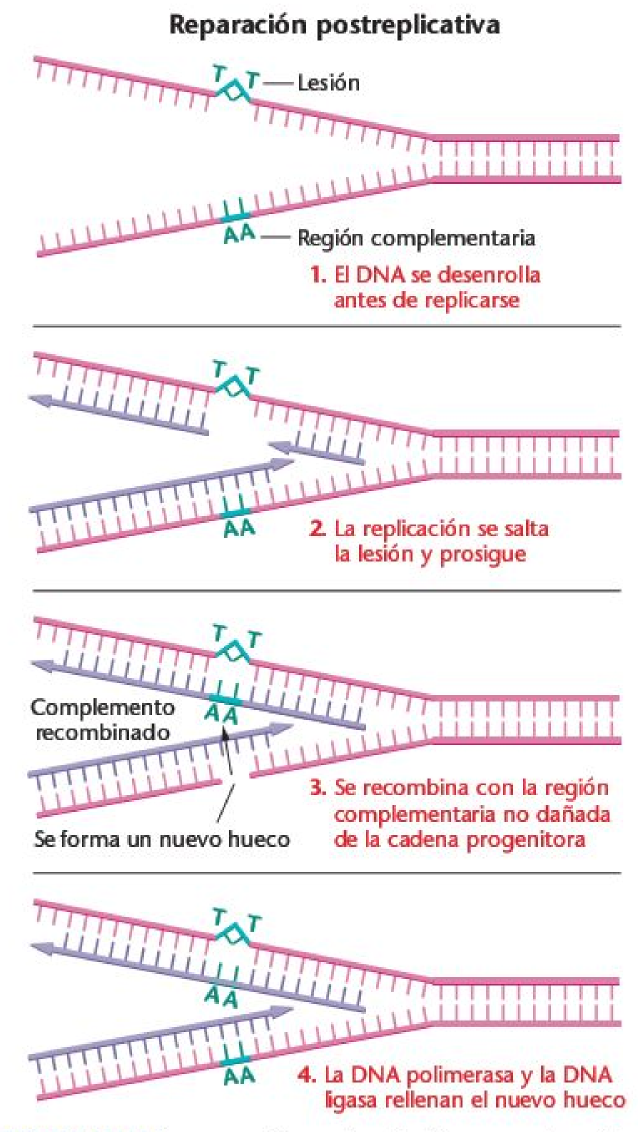


FIGURA 15.14 La reparación postreplicativa se produce si la replicación del DNA ha se ha saltado una lesión como un dímero de timina. Mediante un proceso de recombinación, se recluta la secuencia complementaria correcta de la cadena progenitora y se inserta en el hueco delante de la lesión. La DNA polimerasa y la DNA ligasa rellenan el nuevo hueco.

estudio de la mutagenicidad de la radiación UV preparó el terreno para el descubrimiento de muchas formas de reparación natural del DNA dañado. El primer descubrimiento relevante de la reparación del daño causado por UV en bacterias se realizó en 1949, cuando Albert Kelner observó el fenómeno de la **reparación por fotorreactivación**. Demostró que el daño inducido mediante UV en el DNA de *E. coli* podía revertirse parcialmente si, tras la irradiación, las células se exponían brevemente a luz azul del espectro visible. El proceso de reparación por fotorreactivación también depende de la temperatura, lo que sugiriere que estos mecanismos inducidos por la luz implican una reacción química controlada enzimáticamente.

Estudios posteriores de fotorreactivación han revelado que el proceso se debe a una proteína denominada **enzima fotorreactivadora** (**PRE**, del inglés *photoreactivation enzyme*). La enzima actúa cortando los enlaces entre los dímeros de timina, revertiendo así el efecto de la radiación UV en el DNA (Figura 15.15). Aunque la enzima también se asocia al dímero en la oscuridad, debe absorber un fotón de luz para cortarlo. A pesar de su potencial para disminuir las mutaciones inducidas por UV, la reparación por fotorreactivación no es absolutamente necesaria en *E. coli*, ya que una mutación que genera un alelo de falta de función en el gen que codifica PRE no es letal. Además, esta enzima no puede detectarse en humanos ni en otros eucariotas, los cuales deben depender de otros mecanismos de reparación para revertir los efectos de la radiación UV.

Reparación por escisión de bases y de nucleótidos

Además de PRE, en todos los procariotas y eucariotas existen otros sistemas de reparación independientes de la luz. Los mecanismos básicos implicados en estos tipos de reparación, denominados reparación por escisión, consisten en los tres siguientes pasos, y por lo general pueden describirse como sistemas de «cortar y pegar».

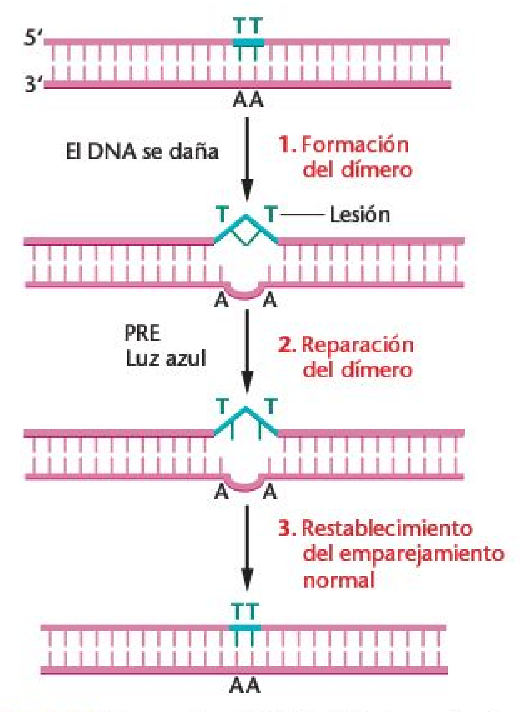


FIGURA 15.15 Reparación del DNA dañado mediante reparación por fotorreactivación. La enzima fotorreactivadora (PRE), que debe ser activada por luz azul de espectro visible, corta el enlace que forma el dímero de timina.

1. Una nucleasa reconoce y corta la distorsión o el error presente en una de las dos cadenas de la hélice de DNA. La escisión del esqueleto fosfodiéster también afecta a diversos nucleótidos adyacentes al error, dejando un hueco en una de las cadenas de la hélice.
2. Una DNA polimerasa rellena el hueco insertando desoxirribonucleótidos complementarios a los de la cadena intacta, utilizándola como molde de replicación. La enzima añade las bases al extremo 3′-OH libre del DNA cortado. En *E. coli*, esta tarea la suele realizar la DNA polimerasa I.
3. La DNA ligasa sella el corte final que queda en el extremo 3′-OH de la última base insertada, cerrando así el hueco.

Hay dos tipos de reparación por escisión: la reparación por escisión de bases y la reparación por escisión de nucleótidos. La **reparación por escisión de bases** (**BER**) corrige daños en las bases nitrogenadas generados por hidrólisis espontánea o por la acción de agentes químicos que las alteran.

En primer paso de la ruta BER en *E. coli* implica que una enzima **DNA glucosilasa**, que son específicas para los distintos tipos de daño del DNA, reconozca la base químicamente alterada (Figura 15.16). Por ejemplo, la uracilo-DNA glicosilasa reconoce la presencia de uracilo en el DNA. un miembro concreto de un grupo de enzimas denominadas reconoce la presencia de uracilo en el DNA. Primero, la enzima corta el enlace glucosílico que hay entre la base y el azúcar creando un sitio apirimidínico (AP). Una enzima denominada **endonucleasa AP** reconoce el azúcar que no tiene su correspondiente base. La endonucleasa hace un corte en esqueleto fosfodiéster en el sitio AP. Esto crea una deformación en el DNA que es reconocida por el sistema de reparación por escisión, que se activa para corregir el error.

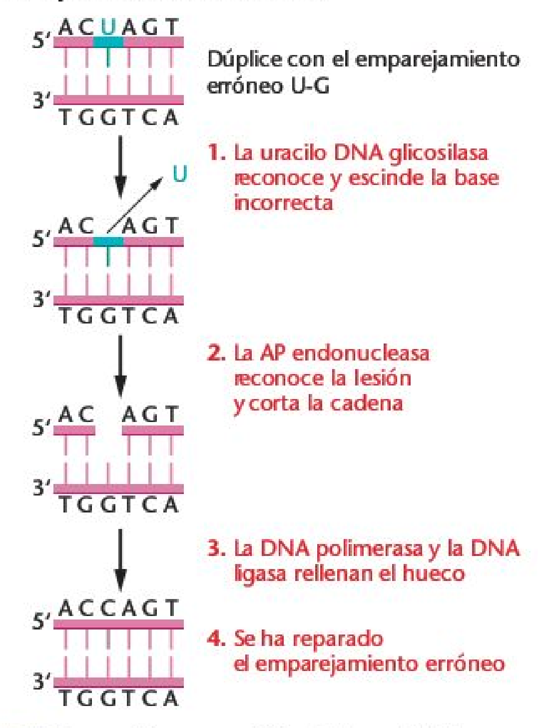


FIGURA 15.16 Reparación por escisión de bases (BER) realizada por la uracilo DNA glicosilasa, la AP endonucleasa, la DNA polimerasa y la DNA ligasa. El uracilo se reconoce como una base no complementaria, se escinde y se reemplaza con la base C complementaria.

Aunque se saben muchas cosas de las DNA glicosilasas en E. coli, se saben pocas cosas sobre las DNA glicosilasas en eucariotas. Además, a diferencia de la ruta de escisión de nucleótidos que se trata a continuación, no hay ningún modelo humano ni animal disponible que sea defectivo para la ruta BER, por lo que es difícil valorar la importancia de esta la ruta en los eucariotas.

Mientras la ruta BER reconoce y reemplaza las bases modificadas del DNA, la ruta de **reparación por escisión de nucleótidos** (**NER**) repara lesiones «voluminosas» en el DNA que alteran o distorsionan la doble hélice, como los dímeros de pirimidina inducidos por UV discutidos anteriormente. Sin embargo, todos los tipos de lesiones voluminosas que conducen a lesiones de la hélice se someten a la ruta NER.

La ruta NER (Figura 15.17) fue descubierta inicialmente por Paul Howard-Flanders y sus colaboradores, quienes aislaron diversos mutantes independientes sensibles a radiación UV. Un grupo de estos genes se designó *uvr* (reparación ultravioleta), e incluyen las mutaciones *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*. En la ruta NER, los productos génicos *uvr* están implicados en el reconocimiento y corte de lesiones en el DNA. Normalmente se corta un número muy específico de nucleótidos a ambos lados de la lesión. En *E. coli*, generalmente se eliminan 13 nucleótidos, incluyendo el lesionado. Entonces la DNA polimerasa I y la DNA ligasa completan la reparación, de manera parecida a la que ocurre en la ruta BER. La cadena no dañada complementaria a la lesión se utiliza de molde para la replicación cuyo resultado la reparación.

Seminario Web 15.4
Reparación de DNA: corrección de pruebas, emparejamientos erróneos y SOS

Xeroderma pigmentosum y reparación por escisión en humanos

Los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en eucariotas es mucho más complejo que en procariotas, e implica a muchas más proteínas. La mayor parte de lo que se sabe sobre este sistema en humanos proviene de estudios detallados de individuos afectados de **xeroderma pigmentosum** (**XP**), una enfermedad genética poco frecuente que predispone a los afectos a graves anormalidades epidérmicas. Estas personas han perdido la capacidad de realizar NER; en consecuencia, las personas que padecen XP que están expuestas a la radiación UV de la luz solar presentan reacciones que van desde pecas y ulceraciones en la piel hasta el desarrollo de cáncer de piel.

Esta enfermedad es muy grave y puede ser mortal, aunque una detección precoz y la protección de la luz solar pueden de-

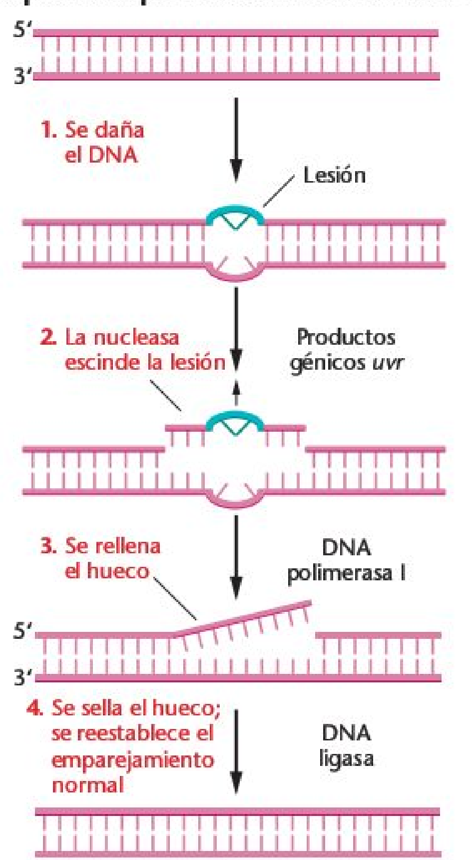


FIGURA 15.17 Reparación por escisión de nucleótidos (NER) de un dímero de timina inducido por UV. Durante la reparación en procariotas se escinden 13 bases, y en eucariotas se escinden 28 bases.

tenerla. La Figura 15.18 compara dos individuos con XP, uno de los cuales fue detectado prematuramente y protegido de la luz solar. Puesto que la luz solar contiene radiación UV, se ha predicho una relación causal entre la producción de dímeros de timina y la XP. Para probar esta hipótesis, se ha investigado la reparación de lesiones inducidas por UV en cultivos de fibroblastos humanos provenientes de individuos XP y de individuos normales. (Los fibroblastos son células indiferenciadas del tejido conectivo.) Los resultados de estos estudios han sugerido que el fenotipo XP es causado por más de un gen mutante.

En 1968, James Cleaver demostró que las células de pacientes afectados de XP eran deficientes en **síntesis de DNA no programada** (síntesis de DNA diferente a la producida durante la replicación de los cromosomas), que se activa en células normales por radiación UV. Puesto que se cree que este tipo de síntesis representa la actividad del sistema de reparación por escisión, la falta de síntesis de DNA no programada en pacientes de XP sugirió que la XP puede ser debida a una deficiencia en la reparación por escisión.

La relación entre XP y reparación por escisión se reforzó todavía más mediante estudios en que se utilizó **hibridación celular somática** (técnica que se introdujo en el Capítulo 5). Cuando se cultivan juntos fibroblastos provenientes de dos pacientes de XP no relacionados, estos pueden fusionarse formando un heterocarión. Un heterocarión es una sola célula con dos núcleos pero con un citoplasma común. Después de fusionarse las dos células con XP, se puede cuantificar su capacidad de realizar reparación por escisión a través de la síntesis de DNA no programada. Si la mutación en cada una de las dos células con XP se ha producido en el mismo gen, el heterocarión no podrá realizar reparación por escisión. Esto se debe a que el heterocarión no tendrá ninguna copia normal de ese gen. Sin embargo, si el heterocarión realiza reparación por escisión, la mutación en las dos células con XP debe estar presente en dos genes diferentes. En este caso se dice que los dos mutantes muestran **complementación**. (En los Capítulos 6 y 21 también se describe la complementación.) La complementación se produce porque el heterocarión tiene al menos una copia normal de cada gen en la célula fusionada. Mediante la fusión de células con XP de un gran número de pacientes afectados de XP, se pudo determinar cuántos genes contribuyen a este fenotipo.

En base a muchos estudios, los pacientes con XP se han agrupado en siete **grupos de complementación**, lo que sugiere que hay al menos siete genes implicados en la reparación por





FIGURA 15.18 Dos personas con xeroderma pigmentosum (XP). El niño de 4 años de la izquierda presenta claras lesiones de piel inducidas por la luz solar. Se pueden ver manchas rojizas (eritema) y cambios irregulares de pigmentación como respuesta a las lesiones celulares. En su nariz hay dos cánceres nodulares. La chica de 18 años de la derecha ha sido cuidadosamente protegida de la luz solar desde que en la infancia se le diagnosticó la xeroderma pigmentosum. Se le han extraído diversos cánceres y ha trabajado de modelo.

escisión en los humanos. En la actualidad ya se han identificado estos siete genes humanos, denominados *XPA* a *XPG* (de gen *A* a gen *G* de *X*erodema *P*igmentosum), junto con sus correspondientes homólogos en levadura. Aproximadamente el 20 por ciento de los pacientes con XP no pertenecen a ninguno de estos siete grupos de complementación. Estos pacientes manifiestan síntomas parecidos, pero sus fibroblastos no presentan una reparación por escisión defectiva. Hay algunas pruebas que indican que estas células con XP son menos eficientes durante la replicación normal del DNA.

Como consecuencia del estudio de los genes defectuosos en la xeroderma pigmentosum, actualmente se saben muchas cosas sobre cómo la NER contrarresta el daño causado en el DNA en las células normales. En los humanos, el primer paso es el reconocimiento del DNA dañado por las proteínas codificadas por los genes *XPC*, *XPE* y *XPA*. Después, estas proteínas reclutan al resto de proteínas implicadas en este proceso de reparación en el sitio del DNA dañado. Los genes *XPB* y *XPD* codifican helicasas, siendo también componentes del factor de transcripción basal TFIIH. Los genes *XPF* y *XPG* codifican nucleasas. El complejo de reparación por escisión, que contiene estos y otros factores, escinde un fragmento de 28 nucleótidos de la cadena de DNA que contiene la lesión.

En las personas afectadas del **síndrome de Cockayne** (**CS**), caracterizada por problemas en el desarrollo físico y neurológico, presentan otro defecto en la ruta NER. Si bien los pacientes con CS, como los afectados de XP, son muy fotosensibles, su enfermedad no se caracteriza por la predisposición a la formación de tumores. Tres de los cinco genes implicados en CS también lo están en XP (*XPB*, *XPD* y *XPG*). Los productos de los cinco grupos de complementación de CS están implicados en la **reparación acoplada a la transcripción**, un tipo de NER en que sólo se repara la cadena transcrita de los genes que se están transcribiendo.

Reparación de roturas de la doble cadena en eucariotas

Hasta este punto, se han discutido las rutas de reparación que tratan los daños producidos en una sola cadena del DNA. Vamos a terminar esta discusión sobre los mecanismos de reparación del DNA considerando qué sucede cuando están cortadas las dos cadenas de la hélice de DNA, por ejemplo como consecuencia de su exposición a radiaciones ionizantes. Si bien estos daños también se producen en bacterias, centraremos esta discusión en las células eucariotas.

En estos casos, se activa un tipo especializado de reparación del DNA, la **reparación de roturas de la doble cadena del DNA** (**reparación DSB**, del inglés *DNA double-stranded break repair*), que hace que las dos cadenas de DNA se vuelvan a unir. Recientemente hay mucho interés en la reparación DSB porque se ha asociado la presencia de defectos en esta ruta con la hipersensibilidad a los rayos X y a deficiencias inmunitarias. Estos defectos también pueden ser la causa de la disposición familiar al cáncer de mama y de ovario.

Otra ruta implicada en la reparación de roturas de la doble cadena es la **reparación por recombinación homóloga**. Mediante un proceso similar al de la reparación postreplicativa, el DNA dañado se recombina y se reemplaza con DNA homólogo no dañado. En este caso, el primer paso del proceso implica la actividad de una enzima que reconoce la rotura de la doble cadena, y después digiere los extremos 5′ de la hélice de DNA rota, lo que deja extremos 3′ protuberantes. Entonces, estos extremos protuberantes interaccionan con la región no dañada de la cromátida hermana, alinea las secuencias homólogas y permite que la DNA polimerasa copie la secuencia de DNA no dañada en la cadena de DNA dañada. La interacción de las dos cromátidas hermanas es necesaria porque, cuando se rompen las dos cadenas de una hélice, no queda ninguna cadena progenitora de DNA no dañada disponible para ser usada como secuencia de DNA molde complementaria durante la reparación. Por lo tanto, se «recluta» la información genética presente en la región homóloga de la cromátida hermana para reemplazar el daño de la rotura de la doble cadena. Normalmente, este proceso ocurre durante la fase S tardía y la fase G2 del ciclo celular, tras la replicación del DNA, momento en que las cromátidas hermanas se encuentran disponibles para ser usadas de molde en la reparación. En levadura, este sistema depende de un complejo de al menos cinco proteínas, denominado complejo RAD52.

Una segunda ruta, denominada **reparación por recombinación no homóloga**, o **unión de extremos**, también repara roturas de la doble cadena. Sin embargo, como su nombre implica, durante la reparación este mecanismo no recluta una región homóloga del DNA. Este sistema se activa durante la fase G1, antes de la replicación del DNA. La unión de extremos implica un complejo de tres proteínas que incluye una proteína quinasa dependiente de DNA. Estas proteínas se unen a los extremos libres de un DNA roto, cortan las puntas y las vuelven a unir. Puesto que en este proceso de unión de los extremos se pierden algunos nucleótidos de la secuencia, este sistema de reparación es propenso a los errores.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que las células reparan la mayor parte de los daños que sufren?

15.9 Los elementos transponibles se mueven dentro del genoma y pueden alterar la función genética

Concluiremos este capítulo discutiendo los **elementos genéticos transponibles**, denominados también **transposones** o «genes saltarines». Estos elementos de DNA pueden moverse o transponerse por el genoma, insertándose a sí mismos en diversas localizaciones dentro de un mismo cromosoma y entre dis-

tintos cromosomas. Los elementos transponibles fueron descubiertos inicialmente por Barbara McClintock en el maíz hace más de 50 años. Sin embargo, la idea de que alguna información genética pudiera no tener una posición fija en el genoma tardó en ser aceptada. El concepto de genes móviles no encajaba en el concepto clásico de los genes como loci discretos que se pueden cartografiar en cromosomas específicos. La importancia de los elementos transponibles no se confirmó hasta que no se descubrieron en otros organismos y no se desveló su base molecular.

Hay transposones en todos los organismos, desde bacterias hasta humano. No solo son ubicuos, sino que también comprenden grandes porciones de algunos genomas eucarióticos. Por ejemplo, la secuenciación genómica reciente ha revelado que al menos el 50 por ciento del genoma humano procede de elementos transponibles. Algunos organismos cuyo genoma es anormalmente largo, como las salamandras y la cebada, contienen cientos de miles de copias de diversos tipos de elementos transponibles. Se desconoce la función de estos elementos, y es extraordinario que los genomas eucarióticos toleren tal cantidad de DNA inútil o inservible. Los datos de la secuenciación del genoma humano sugieren que algunos genes pueden haber evolucionado de los transposones, y que la actividad de los transposones ayuda a modificar y reestructurar el genoma. En este sentido, algunos elementos transponibles pueden conferir beneficios a sus huéspedes.

Los elementos transponibles también han demostrado ser unas herramientas valiosas en investigación genética. Como se describirá en el Capítulo 21, los genéticos han utilizado los transpones como mutágenos, como etiquetas de clonación y como vehículos para introducir DNA foráneo en organismos modelo.

En este capítulo se discutirán los elementos transponibles como mutágenos naturales. Los movimientos de los transposones de un sitio a otro en el genoma tienen la capacidad de interrumpir genes y causar mutaciones, así como también de generar daños cromosómicos como roturas de la doble cadena.

Las secuencias de inserción

Las bacterias presentan dos tipos de elementos transponibles: las secuencias de inserción y los transposones bacterianos. Las **secuencias de inserción (IS)** fueron caracterizadas por primera vez a nivel durante la década de 1970. éstas pueden moverse de un sitio a otro y, si se insertan en un gen o en una región reguladora, pueden causar mutaciones.

Los elementos IS se identificaros por primera vez durante análisis de mutaciones en el operón *gal* de E. *coli*. Los investigadores descubrieron que determinadas mutaciones en este operón eran debidas a la presencia de diversos centenares de pares de bases de DNA extra, insertadas al principio del operón. Estos elementos de DNA son relativamente cortos, no exceden los 2000 pares de bases (2 kb). La primera secuencia de inserción caracterizada en *E. coli*, IS1, tiene unos 800 pares de bases. Otros elementos IS, como IS2 y 3, 4 y 5, tienen entre 1.250 y 1.400 pares de bases de longitud. Los elementos IS presentan muchas copias en el genoma bacteriano. Por ejemplo, el cromosoma de E. coli contienen de 5 a 8 copias de IS1, 5 copias de IS2 y de IS3, y también copias de otros elementos IS como el factor F en los plásmidos.

Todos los elementos IS presentan dos características que son esenciales para su movilidad. En primer lugar, contienen un gen que codifica una enzima denominada **transposasa**. Esta enzima es responsable de cortar el cromosoma bacteriano, en los que los elementos IS pueden insertarse. Segundo, los extremos de los elementos IS contienen repeticiones terminales invertidas (ITR). Los ITR son segmentos cortos de DNA que tienen la misma secuencia nucleotídica pero orientada en direcciones opuestas (Figura 15.19). Aunque la Figura 15.19 muestra que los ITR están formados por unos pocos nucleótidos, en realidad hay muchos más implicados. Por ejemplo, el ITR de IS1 tiene unos 20 pares de nucleótidos, los de IS2 e IS3 tienen unos 40 pares, y el de IS4 tiene unos 18 pares. Los ITR son esenciales para la transposición, y funcionan como sitios de reconocimiento para la unión de la enzima transposasas.

Los transposones bacterianos

Los transposones bacterianos (**elementos Tn**) son más grandes que los elementos IS y contienen genes que codifican proteínas cuya función no está relacionada con la transposición Algunos elementos Tn, como Tn10, están formados por un gen de resistencia a medicamentos flanqueado por dos elementos IS que se encuentran en direcciones opuestas. Los elementos IS codifican la enzima transposasa, que es necesaria para la transposición del elemento Tn. Otros tipos de elementos Tn, como Tn3, tienen secuencias cortas repetidas e invertidas en sus extremos, y tienen un gen transposasa localizado en medio del elemento Tn que codifican su propia enzima transposasa. Como las unidades IS, los elementos Tn son móviles tanto en los cromosomas bacterianos como en los plásmidos, y pueden causar mutaciones si se insertan dentro de genes o en sus regiones reguladoras.

La presencia de repeticiones invertidas en los extremos terminales 3′ y 5′ de los elementos Tn se ha mostrado mediante análisis de microscopia electrónica (Figura 15.20). Cuando se separa el DNA de doble cadena de un plásmido que contiene un elemento Tn en sus cadenas sencillas y se permite que éstas se reasocien por separado, los ITR, que son complementarios, forman un heterodúplex. Todas las otras áreas del elemento Tn y del plásmido permanecen en forma de cadena sencilla, formando lazos a cada lado del pedúnculo de doble cadena.

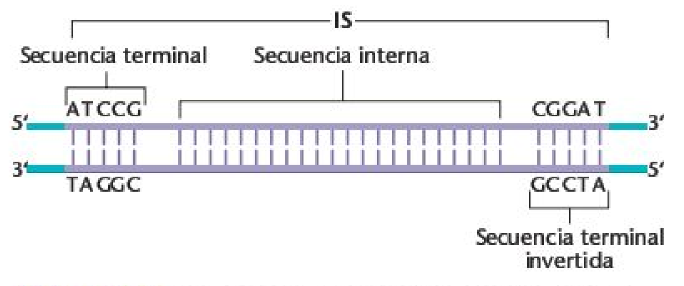


FIGURA 15.19 Secuencia de inserción (IS), en color púrpura. Las secuencias terminales son repeticiones invertidas exactas.

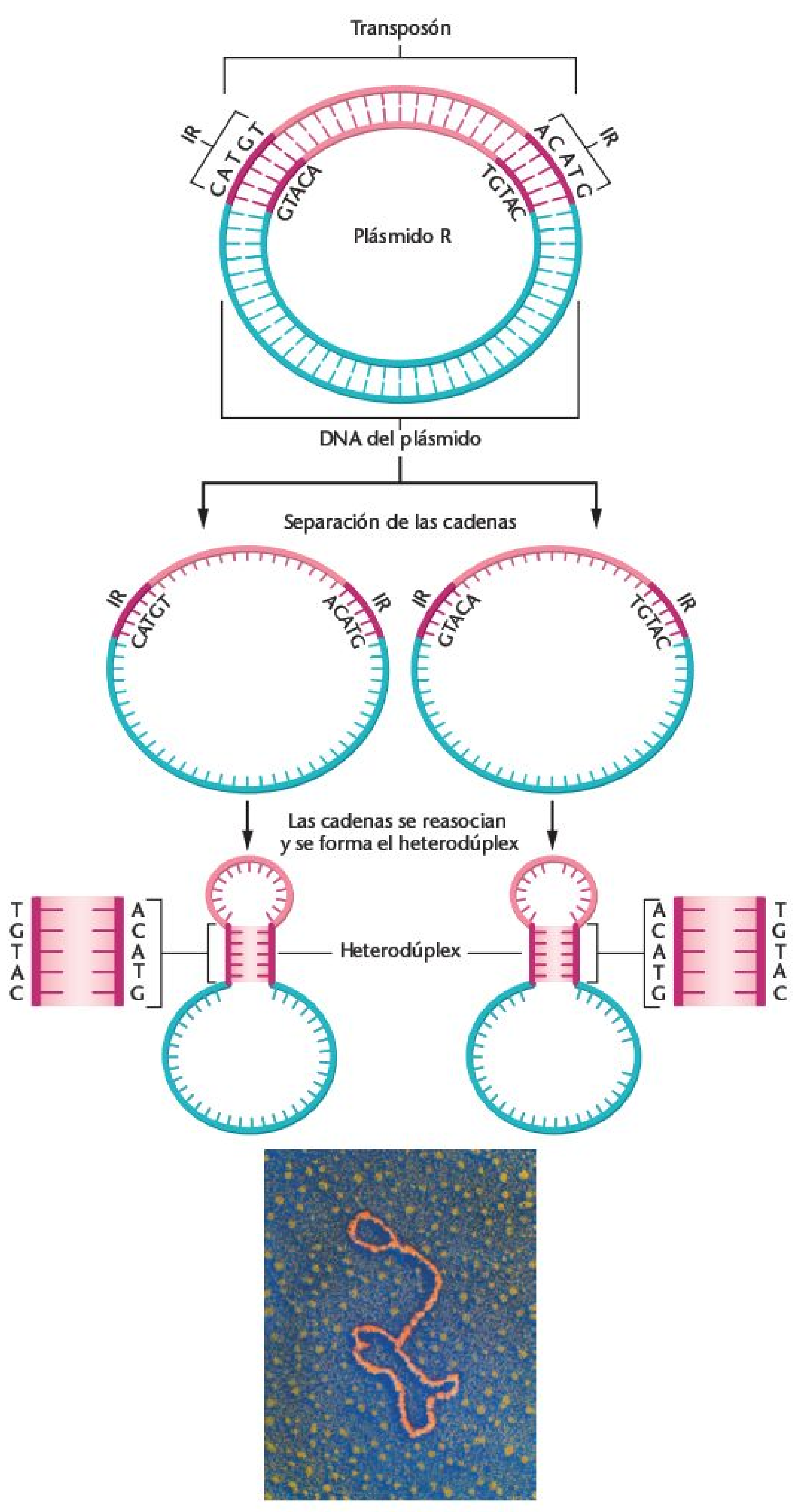


FIGURA 15.20 Formación de un heterodúplex como consecuencia de las secuencias repetidas invertidas de un transposón insertado en un plásmido bacteriano. La micrografía electrónica muestra el heterodúplex final.

En la actualidad, los elementos Tn son un centro de interés porque pueden introducir múltiples resistencias a medicamentos en los plásmidos bacterianos. Estos plásmidos, denominados factores R, pueden contener muchos elementos Tn que confieran simultáneamente resistencia a metales pesados, a antibióticos y a otros medicamentos. Estos elementos se pueden mover de los plásmidos a los cromosomas bacterianos, y pueden propagar las múltiples resistencias entre diferentes cepas de bacterias.

El sistema *Ac-Ds* en maíz

Unos 20 años antes del descubrimiento de los transposones en las bacterias, Barbara McClintock descubrió la presencia de elementos genéticos móviles en las plantas de maíz. Realizó este descubrimiento al analizar el comportamiento genético de dos mutaciones, ***disociador*** **(*Ds*)** y ***activador*** **(*Ac*)**, que se expresan en el endospermo y en las capas de aleurona (Figura 15.21). Entonces correlacionó estas observaciones con el examen citológico de los cromosomas del maíz. Inicialmente, McClintock determinó que el locus *Ds* estaba en el cromosoma 9. Si el locus *Ac* también se encontraba en el genoma, *Ds* introducía una rotura en un punto del cromosoma adyacente a él. Si la rotura se producía durante el desarrollo de células somáticas, a menudo las células descendientes perdían parte del cromosoma roto, lo que causaba diversos efectos fenotípicos.

(a)



(b)



FIGURA 15.21 (a) Barbara McClintock analizando variedades de maíz en su laboratorio. McClintock ganó el Premio Nobel de fisiología y medicina en 1983, cuando tenía 81 años, por su investigación pionera de los elementos genéticos móviles. (b) Panocha de maíz, que muestra variaciones de pigmentación en los granos y entre ellos, debidas a la transposición del elemento *Ds*.

Análisis posteriores sugirieron a McClintock que, a veces, los elementos *Ds* y *Ac* se movían a otras localizaciones cromosómicas. Mientras que *Ds* se movía sólo si *Ac* también estaba presente, *Ac* podía moverse autónomamente. El sitio donde reside *Ds* determinaba el efecto genético que produce; es decir podía provocar la rotura del cromosoma o inhibir la expresión de un determinado gen. En las células en las que *Ds* provocaba la mutación de un gen, éste se podía mover otra vez, revertiendo la mutación al tipo silvestre.

La Figura 15.22 muestra los tipos de movimientos y de efectos provocados por los elementos *Ds* y *Ac*. En las observaciones originales de McClintock, cuando el elemento *Ds* saltaba fuera del cromosoma 9 se recuperaba la síntesis de pigmento. McClintock concluyó que los genes *Ds* y *Ac* eran **ele-**

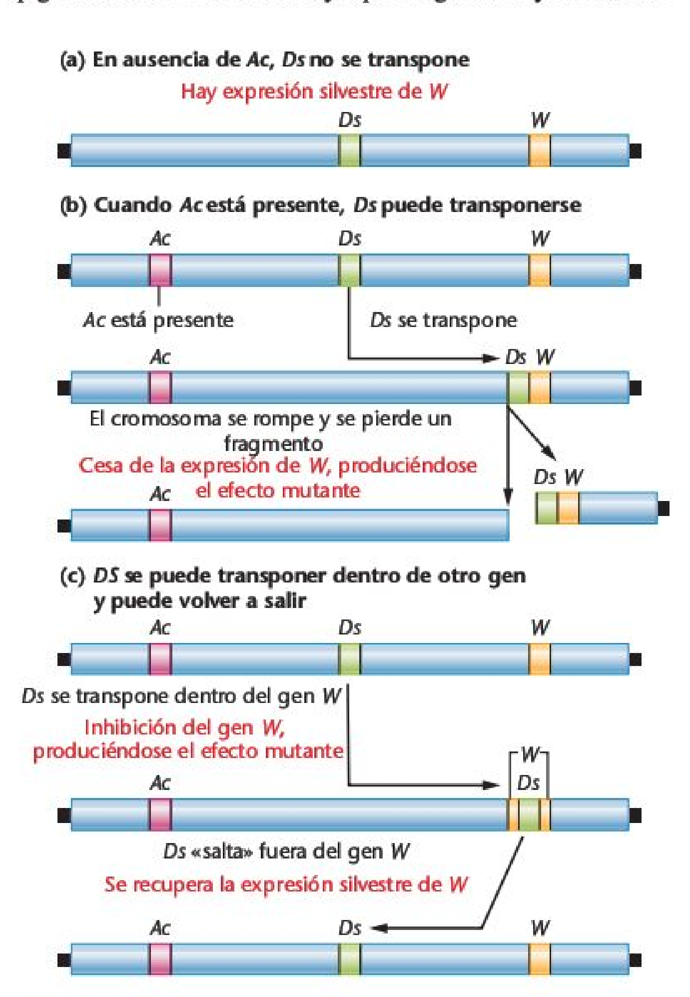


FIGURA 15.22 Efectos de los elementos *Ac* y *Ds* en la expresión génica. (a) Si *Ds* está presente en ausencia de *Ac*, el hipotético gen *W*, localizado a cierta distancia, se expresa con normalidad. (b) En presencia de *Ac*, *Ds* se transpone a una región adyacente a *W*. Ds puede inducir la rotura del cromosoma, lo que puede conducir a la pérdida de un fragmento del cromosoma que contenga el gen *W*. (c) En presencia de *Ac*, *Ds* puede transponerse al interior del gen *W*, alterando su expresión. Si posteriormente *Ds* se transpone fuera del gen *W*, la expresión de este gen puede volver a ser normal.

mentos controladores móviles. En la actualidad nos referimos a ellos de manera común como elementos transponibles, un término que fue acuñado por otro gran genético del maíz, Alexander Brink.

Actualmente se han aislado y analizado minuciosamente varios elementos *Ac* y *Ds*, y se ha clarificado la relación entre ambos (Figura 15.23). El elemento *Ac* tiene 4563 pares de bases y su estructura es sorprendentemente similar a la de los transposones bacterianos. La secuencia de *Ac* contiene dos ITR invertidos imperfectos de 11 pares de bases, dos fases de lectura abiertas (ORF, del inglés *open reading frame*) y tres regiones no codificantes. Uno de los dos ORF codifica la enzima transposasa de *Ac*. El primer elemento *Ds* estudiado (*Ds-a*) es casi idéntico a *Ac* excepto por una deleción de 194 pares de bases en el gen de la transposasa. La deleción de parte de este gen en el elemento *Ds-a* explica por qué depende del elemento *Ac* para su transposición. También se han secuenciado otros elementos *Ds*, mostrando todos deleciones incluso mayores en el gen de la transposasa. Sin embargo, en todos ellos se mantienen los ITR.

Aunque después de sus observaciones iniciales no se valoró suficientemente la importancia de los elementos controladores móviles propuestos por Barbara McClintock, los análisis moleculares han verificado sus conclusiones. En 1983, Barbara McClintock recibió el premio Nobel de fisiología y medicina.

Los elementos genéticos móviles y los guisantes rugosos: una revisión de Mendel

Las investigaciones recientes sobre elementos transponibles en plantas nos devuelven a las observaciones de Gregor Mendel de la herencia en guisantes lisos y rugosos. Ambos fenotipos son consecuencia de dos alelos de un mismo gen, *rugosus*. Actualmente se sabe que el fenotipo rugoso está causado por la ausencia de una enzima, la **enzima ramificadora del almidón (SBEI**, del inglés *starch-branching enzime*), que controla la formación de puntos de ramificación en las moléculas de almidón. La falta de síntesis de almidón en los guisantes rugosos conduce a la acumulación de sacarosa, a un contenido mayor de agua, y a una mayor presión osmótica en las semillas en desarrollo. Al madurar las semillas, las arrugadas (genotipo *rr*) pierden más agua que las lisas (*RR* o *Rr*), produciendo el fenotipo arrugado.

Se ha clonado y caracterizado el gen estructural SBEI de genotipos silvestres y mutantes. En los guisantes de genotipo *rr*, la proteína SBEI no es funcional, probablemente debido a que el gen SBEI está interrumpido por una inserción de 0,8 kb, lo que resulta en la producción de un transcrito de RNA anormal. El DNA insertado tiene repeticiones invertidas de 12 pb en cada extremo, que son muy homólogas a los ITR de los elementos transponibles *Ac* del maíz y a otros elementos de tipo Ac de la becerra y del perejil.

Los elementos *copia* en *Drosophila*

En 1975, David Hogness y sus colaboradores, David Finnigan, Gerald Rubin y Michael Young, identificaron un tipo de elementos de DNA en *Drosophila melanogaster* que denominaron *copia*. Estos elementos transcriben «copiosas» cantidades de RNA (de ahí el nombre). Estos elementos presentan de 10 a 100 copias en el genoma de las células de *Drosophila*. Investigaciones de cartografía muestran que se han transpuesto a diferentes localizaciones cromosómicas y que están dispersos por el genoma.

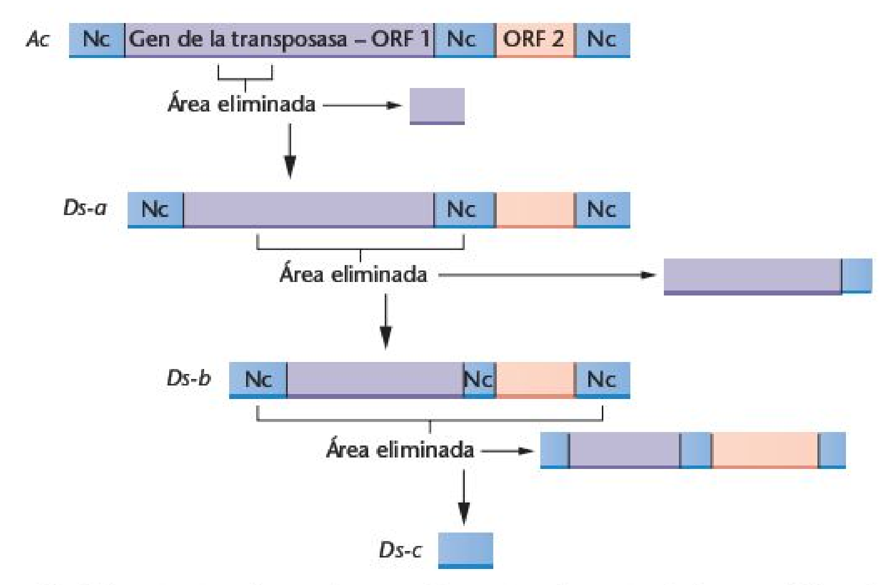


FIGURA 15.23 Comparación de la estructura de un elemento *Ac* con tres elementos *Ds*. Las repeticiones invertidas inexactas están al final del elemento *Ac*. El gen de la transposasa está en la fase de lectura abierta ORF 1. Todavía no se ha asignado ninguna función a ORF 2. Las regiones no codificantes están indicadas por Nc. Como muestra este esquema, *Ds-a* parece ser un elemento Ac que contiene una pequeña deleción en el gen que codifica la enzima transposasa.

Cada elemento *copia* tiene aproximadamente de 5.000 a 8.000 pares de bases de DNA, que incluyen una larga secuencia **repetida terminal directa (DTR)** de 276 pares de bases en cada extremo. En cada una de estas repeticiones hay una secuencia **repetida terminal invertida (ITR)** de 17 pares de bases (Figura 15.24). Estas secuencias ITR cortas son características de los elementos *copia*. Las secuencias DTR se encuentran también en transposones de otros organismos, pero no son universales.

La inserción de un elemento *copia* depende de las secuencias ITR, y parece producirse en dianas específicas del genoma. Los elementos de tipo *copia* muestran efectos reguladores sobre el punto de inserción en el cromosoma. Se ha encontrado que determinadas mutaciones, como algunas que afectan al color de los ojos y a la formación de los segmentos, se deben a inserciones de elementos *copia* dentro de los genes. Por ejemplo, el color de ojos mutante *white-apricot* (w^a), un alelo del gen *white* (w), contiene un elemento *copia* insertado dentro del gen. La transposición del elemento copia fuera del alelo w^a puede restaurar el carácter silvestre del alelo.

Los elementos *copia* son una de las aproximadamente 30 familias de elementos transponibles de *Drosophila*, cada una de las cuales presenta hasta 25-50 copias por genoma. En conjunto, todas estas familias constituyen el 5 por ciento del genoma de *Drosophila* y más de la mitad de DNA medianamente repetitivo de este organismo. Un estudio sugiere que el 50 por ciento de todas las mutaciones visibles en este organismo son debidas a la inserción de transposones en los genes silvestres.

Los elementos transponibles *P* en *Drosophila*

Los elementos transponibles más importantes de *Drosophila* son, quizás, los **elementos *P***. Estos elementos se descubrieron al estudiar el fenómeno de la disgénesis híbrida, una condición que causa esterilidad, una elevada tasa de mutación y reorganizaciones cromosómicas en los descendientes de cruzamientos entre determinadas cepas de moscas. La disgénesis híbrida está causada por una alta tasa de transposición del elemento *P* en la línea germinal, donde los transposones se insertan dentro de genes o cerca de ellos, causando mutaciones. Los elementos *P* tienen de 0,5 a 2,9 kb de longitud, con ITRs de 31 pb. Los elementos *P* completos codifican al menos 2 proteínas, una de las cuales es la enzima transposasa necesaria para la transposición, y la otra es un represor que inhibe este proceso. El gen de la transposasa se expresa sólo en la línea germinal, lo que justifica la especificidad tisular de la transposición de los elementos *P*. Las cepas de moscas que contienen elementos *P* completos insertados en su genoma son resistentes a nuevas transposiciones debido a la presencia de la proteína represora codificada por los elementos *P*.

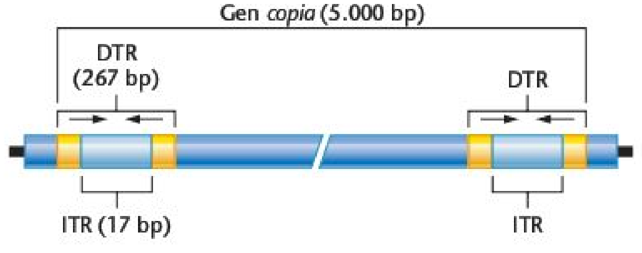


FIGURA 15.24 Organización estructural de un elemento transponible *copia* en *Drosophila melanogaster*, que muestra las repeticiones terminales.

Las mutaciones pueden surgir por distintos tipos de inserciones. Si un elemento *P* se inserta en la región codificante de un gen, puede terminar la transcripción del gen y su expresión génica normal. Si se inserta en la región promotora de un gen, puede afectar al nivel de expresión de ese gen. Las inserciones en intrones pueden afectar al corte y empalme o bien causar la terminación prematura de la transcripción.

Como se describe en el capítulo 21, los genéticos han explotado los elementos *P* como herramientas para el análisis genético. Una de las aplicaciones más útiles de los elementos *P* es como vectores para introducir transgenes en *Drosophila*, una técnica que se denomina **transformación de la línea germinal**. Los elementos *P* también se utilizan para generar mutaciones y clonar genes mutantes. Además, los investigadores están perfeccionando métodos para dirigir las inserciones de elementos *P* a sitios cromosómicos únicos y precisos, lo que debería incrementar la precisión de la transformación de la línea germinal para el análisis de la actividad génica.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que los transposones se mueven dentro del genoma?

Elementos transponibles en la especie humana

El genoma humano, como el de los otros eucariotas, está lleno de DNA que procede de transposones. Datos recientes de la secuenciación del genoma revelan que aproximadamente la mitad del genoma humano está formado de elementos transponibles de DNA.

Como se vio en el Capítulo 12, las principales familias de transposones humanos son los elementos dispersos largos y los elementos dispersos cortos (**LINES** y **SINES**, respectivamente) Los LINES son elementos de DNA de unas 6 kb de longitud, y hay hasta 850.000 copias. En total, los LINES justifican el 21 por ciento del DNA genómico humano. Los SINES tienen unos 100 a 500 pb de longitud, y hay aproximadamente 1,5 millones de copias en las células humanas. Los SINES comprenden aproximadamente el 13 por ciento del DNA genómico humano. Otras familias de elementos transponibles justifican otro 11 por ciento del genoma humano. Puesto que las secuencias codificantes sólo comprenden el 5 por ciento del genoma humano, en el genoma humano hay 10 veces más elementos transponibles de DNA que genes funcionales.

Aunque la mayor parte de transposones humanos parecen ser inactivos, su movilidad potencial y los efectos mutagénicos de estos elementos tienen grandes implicaciones para la genética humana, como puede verse en un ejemplo reciente de un transposón «cogido con las manos en la masa». Es el caso de un niño con hemofilia. Una de las causas de la hemofilia es un defecto en el factor sanguíneo de coagulación VIII, el producto de un gen ligado al cromosoma X. Haig Kazazian y sus colaboradores encontraron LINES insertados en dos puntos del gen. Estos investigadores se interesaron en determinar si uno de los cromosomas X de la madre también contenía este LINE concreto. Si fuese así, la madre, que no estaba afectada, sería heterocigótica y habría pasado el cromosoma que contenía el LINE a su hijo. El hallazgo sorprendente fue que la secuencia LINE *no* se encontraba en ninguno de los dos cromosomas X, pero *se detectó* en el cromosoma 22 de ambos progenitores. Esto sugiere que este elemento móvil puede haberse transpuesto de un cromosoma a otro en las células formadoras de gametos de la madre, antes de ser transmitido a su hijo.

Hay dos casos independientes de personas afectadas de distrofia muscular de Duchenne como consecuencia de la inserción de un LINE en el gen de la *distrofina*. En uno de los casos, un transposón se insertó en el exón 48, y en el otro lo hizo en el exón 44, conduciendo en ambos casos, a la terminación prematura de la traducción de la proteína distrofina. También se han publicado inserciones de LINES en los genes *APC* y *c-myc*, que han conducido a mutaciones que pueden haber contribuido al desarrollo de algunos cánceres de colon y de mama. En estos últimos casos, la transposición se ha producido sólo en una célula somática, o en unas pocas de ellas.

Las inserciones de SINES también son responsables de diversos casos de enfermedades humanas. En uno de estos casos, un **elemento Alu** se integró en el gen BRCA2 inactivando este gen supresor de tumores, lo que condujo a un caso de cáncer de mama familiar. Otros genes que han mutado por la integración de un elemento *Alu* son el gen del factor IX (lo que conduce a hemofilia B), el gen *ChE* (lo que conduce a acolinesterasemia) y el gen *NF1* (lo que conduce a neurofibromatosis).



Genética, tecnología y sociedad

El legado de Chernóbil

El 26 de Abril de 1986, el reactor 4 de la central nuclear de Chernóbil explotó, expulsando grandes cantidades de material radiactivo a las regiones cercanas y por todo el hemisferio norte. Este accidente provocó la muerte de 31 trabajadores de los servicios de emergencia, y causó graves problemas debidos a la radiación a otros 200 operarios. Durante los nueve días que siguieron a la explosión, al acercarse la temperatura del reactor al punto de fusión, se liberaron a la atmósfera productos radiactivos de la fisión, como yodo, xenón, estroncio y cesio. La lluvia radiactiva viajo a través de Europa central, alcanzando Finlandia y Suecia tres días después de la explosión inicial, y el Reino Unido y América del norte una semana después de la explosión. Millones de personas estuvieron expuestas a cantidades de radiación que podían ser medidas. Las personas que vivían dentro de un radio de 30 km (14 millas) de Chernóbil estuvieron expuestas a altos niveles de radiactividad antes de ser evacuadas, 36 horas después del accidente. Igualmente altas fueron las exposiciones de algunos de los 600.000 trabajadores militares y civiles que fueron enviados a Chernóbil para descontaminar el área y cubrir con un sarcófago el reactor destruido.

El accidente de Chernóbil fue la mayor liberación accidental de material radiactivo del mundo. La pregunta que cabe hacerse es si la contaminación radiactiva de Chernóbil amenaza directamente la salud a largo término de millones de personas.

El agente tóxico cuyos efectos sobre la salud humana son más conocidos es la radiación ionizante (a excepción, quizás, del humo del tabaco). La radiación ionizante (como los rayos X y los rayos gama) es un grupo de radiaciones que poseen suficiente energía como para expulsar electrones de los átomos. Las radiaciones ionizantes pueden dañar cualquier componente celular, alterar los nucleótidos e inducir roturas de la doble cadena del DNA. Estas lesiones del DNA pueden conducir a mutaciones y a translocaciones cromosómicas.

Las dosis altas de radiación ionizante incrementan el riesgo de desarrollar determinados tipos de cáncer. Los supervivientes de las bombas atómicas lanzadas sobre Hiroshima y Nagasaki mostraron un incremento en la incidencia de leucemia en los dos años siguientes a la explosión de las bombas. La incidencia del cáncer de mama se incrementó 10 años después de la explosión, como también lo hicieron las incidencias de los cánceres de pulmón, tiroides, colon, ovario, estómago y del sistema nervioso. Puesto que la radiación ionizante induce daños en el DNA, se esperaba que los descendientes de los supervivientes mostrasen un incremento en el número de defectos de nacimiento, aunque no se detectó tal incremento.

El problema de extrapolar datos de Hiroshima a Chernóbil es la diferencia en la dosis. En los supervivientes de las bombas atómicas, la tasa de cáncer incrementó entre las personas expuestas al menos a 200 mSv (mSv = milisevert, una unidad de radiación absorbida). Se estima que las personas que vivían en las áreas más contaminadas cercanas a Chernóbil podrían haber recibido unos 50 mSv, y algunos trabajadores implicados en la limpieza de la

radiactividad estuvieron expuestos aproximadamente a 250 mSv. Fuera del área de Chernóbil, la dosis de radiación se estimó en 0,4 a 0,9 mSv en Alemania y Finlandia, 0,01 mSv en el Reino Unido, y 0,0006 mSv en los EEUU.

Para relativizar estos valores, la dosis promedio anual en diagnósticos médicos (como rayos X aplicados en el pecho o en las piezas dentales) es de 0,39 mSv por año. La exposición de una persona a radiaciones de origen natural ambiental (rayos cósmicos, rocas y gas radón) es de unos 2 a 3 mSv por año. Los fumadores se exponen a si mismos a una dosis de 2,8 mSv por año al inhalar materiales radiactivos que se encuentran de manera natural en el humo del tabaco.

Parece que las tasas de mutación en las plantas y en los animales expuestos a los residuos radiactivos de Chernóbil pueden ser de dos a diez veces superiores a los normales. Los trabajadores implicados en la limpieza de Chernóbil presentan una frecuencia de mutación del locus *HPRT* un 25 por ciento superior a la normal. La tasa de mutación en los minisatélites en los niños nacidos en las áreas contaminadas es el doble que las detectadas en controles el Reino Unido. Pero, ¿este incremento en la tasa de mutación se traducirá en efectos sobre la salud?

Entre las 115.000 personas evacuadas de Chernóbil, se estimó que se producirían 26 casos de leucemia más que los 25 a 30 que deberían ocurrir de manera espontánea. También se estimó que entre los europeos se producirían hasta 17.000 casos más de cáncer, además de los 123 millones que se producirían de manera normal. Sin embargo, hasta la actualidad no ha habido ningún incremento detectable en el número de casos de leucemia o de tumores sólidos en las áreas contaminadas de la extinta Unión Soviética, en Finlandia y en Suecia, ni en los 600.000 trabajadores implicados en la limpieza de Chernóbil.

A pesar de la falta de un incremento detectable de leucemias y de tumores sólidos, hay un tipo de cáncer que sí se ha incrementado en el área de Chernóbil. La tasa de cáncer de tiroides infantil ha llegado a más de 100 casos por millón de niños y año, mientras que las tasas normales se espera que sean de 0,5 a 3 casos por a millón de niños y año. Aunque los epidemiólogos debaten si estos incrementos son debidos en su totalidad a la radiación o a un incremento en los casos denunciados, la proporción del incremento y el hecho de que los isótopos radiactivos del yodo formen una parte importante de la lluvia radiactiva de Chernóbil establecen una relación plausible entre el cáncer de tiroides y la lluvia radiactiva de Chernóbil.

Los efectos inmediatos más profundos de Chernóbil han sido los psicológicos. Los trabajadores que limpiaron Chernóbil han mostrado un incremento del 50 por ciento en los casos de suicidio, y un incremento detectable en enfermedades relacionadas al tabaco y al alcohol. Esto concuerda con otros estudios que muestran que el 45 por ciento de las personas que viven en un radio de 300 km alrededor de Chernóbil creen padecer enfermedades inducidas por la radiación. También se han documentado otros efectos sobre la salud, como depresión, anomalías del sueño, hipertensión y percepción alterada. El estrés postraumático puede ser una amenaza más grande para la salud que la exposición real a la radiación del accidente. Las personas sienten que viven constantemente amenazadas, y esperan los resultados de la «lotería» del cáncer. Incluso si las tasas de cáncer y los defectos genéticos no se incrementan dramáticamente, los efectos indirectos sobre la salud de la explosión de la Central Nuclear de Chernóbil son (y continuarán siendo) inmensos.

Referencias

Ginzberg, H.M. 1993. The psychological consequences of the Chernobyl accident-Findings from the International Atomic Energy Agency study. *Publ. Health Rep*. 108:184-92.

Jacob, P. et al. 2000. Thyroid cancer risk in Belarus after the Chernobyl accident: Comparison with external exposures. *Rad. and Env. Biophys.* 39:25-31.

Rahu, M. et al. 1997. The Estonian study of Chernobyl cleanup workers: II. Incidence of cancer and mortality. *Radiation Res*. 147:653-57.

Williams, D. 1994. Chernobyl, eight years on. *Nature* 371:556.

Páginas Web

Comité Científico de las Naciones Unidas para los Efectos de la Radiación Atómica, 3.° Conferencia Internacional, junio de 2001. *http://www.unscear.org/pdffiles/kievconlus.pdf*

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Las mutaciones proporcionan la base para la variación genética, la evolución y el análisis genético
2. Una mutación se define como una alteración en la secuencia del DNA. Una mutación puede generar un fenotipo detectable, o no generar ningún fenotipo detectable.
3. Las mutaciones puede ser espontáneas o inducidas, somáticas o de la línea germinal, autosómicas o ligadas al sexo.
4. Las mutaciones pueden tener muchos efectos diferentes sobre la función de los genes en función del tipo de cambio nucleotídico que comprenda la mutación. Las mutaciones puntuales en las regiones codificantes de un gen pueden conducir a mutaciones de cambio de sentido o a mutaciones sin sentido. Las inserciones y las deleciones en las regiones codificantes pueden conducir a mutaciones de cambio de fase de lectura y a la terminación prematura de la traducción.
5. Los efectos fenotípicos de las mutaciones pueden ser variados, desde mutaciones de pérdida de función y *knockouts* génicos, a mutaciones de ganancia de función que confieren una nueva actividad el producto génico.
6. La tasa de mutación espontánea varía considerablemente entre organismos y entre genes diferentes de un mismo organismo.
7. Las mutaciones espontáneas se pueden producir por muchos mecanismos, desde errores de la replicación del DNA hasta daños producidos en las bases del DNA como consecuencia del metabolismo celular normal.

8. Las mutaciones también pueden ser inducidas por muchos tipos de productos químicos y por radiaciones. Estos agentes pueden dañar tanto las bases como el esqueleto azúcar-fosfato de las moléculas de DNA.
9. Los grupos sanguíneos ABO de los humanos deben su variación a mutaciones puntuales o de cambio de fase en el gen que codifica la enzima que modifica la sustancia H.
10. La mayor parte de las mutaciones que conducen a distrofias musculares son inserciones y deleciones que generan cambios en la fase de lectura de la traducción del gen *distrofina*.
11. Las mutaciones en regiones repetidas de algunos genes conducen a enfermedades humanas como el síndrome de X frágil, la distrofia miotónica y la enfermedad de Huntington.
12. Aunque para analizar las mutaciones en organismos modelo se utiliza un amplio espectro de técnicas genéticas y bioquímicas, la caracterización de las mutaciones humanas suele empezar por el análisis del árbol genealógico.
13. El ensayo de Ames permite que los científicos valoren el potencial mutagénico y cancerígeno de agentes químicos, mediante el seguimiento de la tasa de mutación en cepas bacterianas específicas.
14. Los organismos contrarrestan tanto las mutaciones espontáneas como las inducidas usando sistemas de reparación del DNA. Los errores en la síntesis del DNA se pueden reparar mediante la lectura de pruebas durante la replicación, la reparación de emparejamientos erróneos y la reparación postreplicativa.
15. Otros tipos de daños del DNA se pueden reparar mediante reparación por fotorreactivación, reparación SOS, reparación por escisión de bases o de nucleótidos y reparación de roturas de la doble cadena.
16. Mutaciones en los genes que controlan la reparación por escisión de nucleótidos en los humanos pueden conducir a enfermedades como la xeroderma pigmentosum y el síndrome de Cockayne.
17. los elementos transponibles se pueden mover dentro del genoma y generar mutaciones si se insertan dentro de un gen o cerca de él. También se han explotado como herramientas de disección genética para generar mutaciones, clonar genes e introducir genes foráneos en organismos modelo.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. El análogo de base 2-aminopurina (2-AP) sustituye a la adenina durante la replicación del DNA, pero se puede emparejar con la citosina. El análogo de base 5-bromouracilo (5-BU) sustituye a la timidina, pero se puede emparejar con la guanina. Siga la secuencia trinucleotídica de doble cadena que se muestra a continuación durante tres ciclos de replicación, suponiendo que en el primer ciclo se encuentran los dos análogos y que se incorporan donde sea posible. Estos son eliminados en el segundo y tercer ciclo de replicación. ¿A qué secuencias finales conducen?

2. Se investigó una mutación dominante poco frecuente en humanos que se expresa al nacer. Los registros mostraron seis casos en 40.000 nacimientos. Las genealogías familiares mostraron que, en dos de los casos, la mutación ya se presentaba en uno de los padres. Calcule la tasa de mutación espontánea para esta mutación. ¿Qué suposiciones subyacentes pueden afectar a las conclusiones?

Solución: Sólo cuatro casos representan una nueva mutación. Como cada nacimiento representa dos gametos, el tamaño de la muestra es de 80.000 sucesos meióticos. La tasa es igual a

$$4/80{,}000 = 1/20{,}000 = 0{,}5 \times 10^{-4}$$

Hemos supuesto que el gen mutante presenta penetración completa y que se expresa en todos los individuos que lo llevan. Si no tuviese penetración completa, nuestro cálculo sería una estima a la baja, debido a que podríamos no haber detectado una o más mutaciones. También hemos supuesto que el examen fue 100 por ciento preciso. Uno o más individuos mutantes podrían haberse «perdido», conduciendo otra vez a una estimación a la baja. Finalmente, hemos supuesto que la viabilidad de los individuos mutantes y la de los no mutantes son iguales y que todos sobreviven igualmente *in utero*. Por lo tanto, suponemos que el número de individuos mutantes en el nacimiento es igual al número en el momento de la concepción. Si esto no fuese cierto, nuestro calculo sería de nuevo una estima a la baja.

3. Considere las siguientes estimaciones:

(a) Hay $5{,}5 \times 10^9$ seres humanos viviendo en el planeta.

(b) Cada individuo tiene unos 30.000 ($0{,}3 \times 10^5$) genes.

(c) La tasa media de mutación en cada locus es de 10^{-5}.

¿Cuantas mutaciones espontáneas hay actualmente en la población humana? Suponiendo que estas mutaciones se distribuyan homogéneamente entre todos los genes, ¿Cuántas mutaciones nuevas han surgido en cada gen en la población humana?

Solución: Primero, como cada individuo es diploide, hay dos copias de cada gen por persona, cada uno proveniente de un gameto separado. Por lo tanto, el número total de mutaciones espontáneas es:

$$(2 \times 0{,}3 \times 10^5 \text{ genes/individuo}) \times (5{,}5 \times 10^9 \text{ individuos}) \times (10^{-5} \text{ mutaciones/gen})$$
$$= (0{,}6 \times 10^5) \times (5{,}5 \times 10^9) \times (10^{-5}) \text{ mutaciones}$$
$$= 3{,}3 \times 10^9 \text{ mutaciones en la población}$$
$$3{,}3 \times 10^9 \text{ mutaciones}/0{,}6 \times 10^5 \text{ genes}$$
$$= 5{,}5 \times 10^4 \text{ mutaciones por gen en la población}$$

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN



1. Exponga la importancia de las mutaciones para la investigación en genética.
2. Describa la técnica de detección de mutantes nutricionales en *Neurospora.*
3. Se cree que la mayoría de mutaciones son deletéreas. ¿Por qué, pues, es razonable afirmar que las mutaciones son esenciales para el proceso de la evolución?
4. ¿Por qué supone que es más probable que una mutación aleatoria sea deletérea en vez de beneficiosa?
5. La mayoría de las mutaciones de un organismo diploide son recesivas. ¿Por qué?
6. ¿Qué significa mutación condicional?
7. Describa cambio tautomérico y la manera en que puede conducir a una mutación.
8. Compare los efectos mutagénicos de los agentes desaminantes, de los agentes alquilantes y de los análogos de bases.
9. Los colorantes de acridina inducen mutaciones de cambio de fase. ¿Por qué es más probable que las mutaciones de cambio de fase sean más perjudiciales que las mutaciones puntuales, en la que se haya sustituido una única purina o pirimidina?
10. ¿Por qué los rayos X son unos mutágenos más potentes que la radiación UV?
11. Compare los mecanismos por los que la radiación UV y los rayos X causan mutaciones.
12. Compare los distintos tipos de mecanismos de reparación del DNA que se sabe que contrarrestan los efectos de la radiación UV. ¿Cuál es la función de la luz visible en la reparación de las mutaciones inducidas por UV?
13. La mamografía es una técnica de rastreo fiable para la detección precoz de cáncer de mama en humanos. Es una técnica muy controvertida ya que utiliza rayos X para establecer el diagnóstico. ¿Puede explicar por qué? ¿Qué razones justifican la utilización de rayos X en este tipo de diagnóstico médico?
14. Explique las bases moleculares del síndrome del cromosoma X frágil, de la distrofia miotónica y de la enfermedad de Huntington, y cómo el tipo de mutación implicada en cada una de estas enfermedades se relaciona con la gravedad de la misma, así como con el fenómeno denominado anticipación genética.
15. Describa el ensayo de Ames para el rastreo de potenciales mutágenos ambientales. ¿Por qué se cree que una sustancia que da positiva en el ensayo de Ames puede ser también carcinogénica?
16. ¿Qué defectos genéticos produce la enfermedad xeroderma pigmentosum (XP) en los humanos? ¿Cómo generan estos defectos los fenotipos asociados a esta enfermedad?

24. Se añade un potente mutágeno a un cultivo bacteriano cuyas células no pueden sintetizar leucina (leu^-), y se permite que las bacterias realicen un ciclo de replicación. Entonces, se toman muestras, se realizan bancos de diluciones, y se siembran las células en medio mínimo o en medio mínimo al que se ha añadido leucina. La primera condición de cultivo (medio mínimo) sólo permite el crecimiento de células leu^+, mientras que la segunda condición de cultivo (medio mínimo con leucina añadida) permite que crezcan todas las células. A continuación se muestran los resultados del experimento.

Condiciones de cultivo	Dilución	Colonias
medio mínimo	10^{-1}	18
mínimo + leucemia	10^{-7}	6

¿Cuál es la tasa de mutación en el locus implicado en la biosíntesis de la leucina?

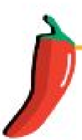
18. Compare los diferentes elementos genéticos transponibles en bacterias, maíz, *Drosophila* y la especie humana. ¿Qué características comparten?
19. En el descubrimiento inicial de las unidades IS en bacterias, la unidad IS estaba situada en la región 5′ corriente arriba de tres genes que controlaban el metabolismo de la galactosa. Los tres genes se vieron afectados a pesar de que sólo había un IS insertado. Explique por qué puede ocurrir esto.
20. Se ha encontrado que Ty, un elemento transponible de levadura, contiene una fase de lectura abierta (ORF) que codifica la enzima transcriptasa reversa. Esta enzima sintetiza DNA a partir de un molde de RNA. Especule sobre la función de este producto génico en la transposición de Ty en el genoma de levadura.
21. Se ha observado que muchos transposones de los humanos y de otros organismos se localizan en regiones no codificantes del genoma, como en intrones, en pseudogenes, y en trechos de tipos específicos de DNA repetitivo. Hay varias maneras de interpretar esta observación. Describa dos posibles interpretaciones. ¿Qué explicación apoya? ¿Por qué?
22. Especule sobre cómo la mejora de las condiciones de vida y de la atención médica en los países desarrollados puede afectar a la tasa de mutación en humanos, tanto las neutrales como las perjudiciales.
23. El medicamento anticanceroso melfalán es un agente alquilante de la familia del gas mostaza. Actúa de dos maneras diferentes: provocando la alcalinación de las bases de guanina, y uniendo ca-

denas de DNA entre sí. Describa dos maneras por las que el malfalán podría matar las células cancerosas. ¿De qué dos maneras las células cancerosas pueden reparar los efectos dañinos sobre el DNA del malfalán?

24. Las distrofias musculares son algunas de las enfermedades hereditarias de los humanos más comunes, y son el resultado de un gran número de mutaciones diferentes en el gen de la *distrofina*. Especule sobre por qué este gen parece sufrir tantas mutaciones.

25. Describa cómo puede conducir el proceso de replicación del DNA a la expansión de regiones de trinucleótidos repetidos en el gen responsable de la enfermedad de Huntington.

26. El origen de la mutación que llevó la hemofilia a la familia de la reina Victoria es controvertido. Su padre no tenía hemofilia ligada al cromosoma X, y no hay ninguna prueba de que algún miembro de la familia de su madre tuviese esa condición. ¿Cuáles son algunas de las posibles explicaciones de cómo surgió la mutación? ¿Qué tipos de mutaciones podrían conducir a esta enfermedad?



Problemas extra-picantes

27. A continuación se muestran los descubrimientos hipotéticos obtenidos en una investigación de heterocariontes formados a partir de siete cepas celulares humanas afectadas de xeroderma pigmentosum.

	XP1	XP2	XP3	XP4	XP5	XP6	XP7
XP1	–						
XP2	–	–					
XP3	–	–	–				
XP4	+	+	+	–			
XP5	+	+	+	+	–		
XP6	+	+	+	+	–	–	
XP7	+	+	+	+	–	–	–

Nota: + = complementación; – = no complementación.

Estos datos representan la síntesis de DNA no programada en los heterocariontes fusionados. Ninguno de ellos presenta síntesis de DNA no programada por sí solo. ¿Qué representa la síntesis de DNA no programada? ¿Qué cepas están dentro del mismo grupo de complementación? ¿Cuantos grupos hay según estos datos? A partir de estos datos, ¿qué se puede concluir sobre la base genética de la XP?

28. Imagine que pertenece al equipo de genéticos que emprendió la investigación de los efectos genéticos de la radiación de alta energía en la población japonesa que sobrevivió a las bombas atómicas de Hiroshima y de Nagasaki en 1945 inmediatamente después del ataque. Demuestre sus conocimientos en mutación cromosómica y génica esbozando un proyecto lógico a corto y largo plazo que aborde esta cuestión. Asegúrese de incluir estrategias para considerar los efectos tanto en tejidos somáticos como en germinales.

29. La fibrosis quística (CF) es una enfermedad autosómica recesiva grave en humanos que se produce como consecuencia de un defecto en un canal de transporte de iones cloro en las células epiteliales. Se han identificado más de 500 mutaciones en la secuencia de los 24 exones del gen responsable (*CFTR*, regulador transmembrana de la fibrosis quística), entre las que hay docenas de diferentes mutaciones sin sentido y de cambio de fase, y numerosos defectos del sitio de corte y empalme. Aunque todos los individuos afectados de CF muestran obstrucción crónica de los pulmones, hay variaciones en la insuficiencia de la enzima pancreática (PI). Especule sobre qué tipos de mutaciones observadas es probable que generen los síntomas menos graves de DF, incluyendo solo leve PI. Algunas de las 300 alteraciones de la secuencia que se han detectado en las regiones exónicas del gen *CFTR* no producen a fibrosis quística. Teniendo en cuenta todo lo que sabe sobre el código genético, la expresión génica, la función de las proteínas y las mutaciones, explique el motivo de esto como si lo hiciese a una persona con pocos conocimientos de biología.

30. Se sabe que los oxidantes electrofílicos generan la base modificada en el DNA denominada 7,8-dihidro-oxoguanina (oxoG). Si bien la guanina se empareja con la citosina, la oxoG se empareja tanto con la citosina como con la adenina.

(a) ¿Cuál es el origen celular de los oxidantes reactivos que causan este tipo de alteraciones?

(b) Basándose en sus conocimientos sobre la química de los nucleótidos, dibuje la estructura de oxoG, y debajo la de la guanina. Dibuje una citosina al lado de la guanina, incluyendo los puentes de hidrógeno que permiten que estas dos moléculas se emparejen. ¿Proporciona la comparación de la estructura de oxoG con la de la guanina alguna pista de por qué la oxoG puede emparejarse con la adenina?

(c) Suponga que hay una lesión oxoG no reparada en la hélice de DNA delante de una citosina. Tras diversas rondas de replicación, prediga el tipo de mutación que se producirá.

(d) ¿Qué mecanismos de reparación del DNA podrían actuar para contrarrestar una lesión oxoG? ¿Cuál de ellos sea probablemente el más eficiente?

(Bibliografía: Bruner, S.D., et al. 2000. *Nature* 403:859-62.)

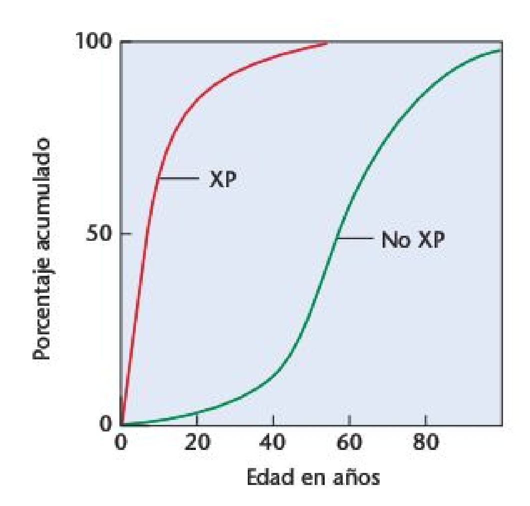
31. En el universo de Star Trek®, la habilidad de los Betazoides de leer la mente se encuentra controlada por un gen denominado «*lector de mentes*» (que se abrevia *lm*). La mayoría de los betazoides pueden leer las mentes, pero mutaciones recesivas poco frecuentes en el gen *lm* generan dos fenotipos alternativos: los *receptores retardados* y los *insensibles*. Los receptores retardados tienen cierta habilidad para leer la mente, pero lo hacen de manera mucho más lenta que los Betazoides normales. Los insensibles no pueden leer las mentes. Los genes de los Betazoides no tienen intrones, por lo que sus genes sólo contienen DNA codificante. El gen *lm* está formado por 3.332 nucleótidos, y los Betazoides utilizan un código genético de cuatro letras.

La tabla que se muestra a continuación presenta algunos datos de cinco mutaciones de *lm* no relacionadas.

Descripción de la mutación	Fenotipo
mr-1 Mutación sin sentido en el codón 829	receptor retardado
mr-2 Mutación de cambio de sentido en el codón 52	receptor retardado
mr-3 Deleción de los nucleótidos 83-150	receptor retardado
mr-4 Mutación de cambio de sentido en el codón 192	insensible
mr-5 Deleción de los nucleótidos 83-93	insensible

Proponga una explicación plausible para explicar por qué cada una de estas mutaciones da lugar a su fenotipo asociado y no a otro. Por ejemplo, hipotetice por qué la mutación sin sentido *lm-1* en el codón 829 produce un fenotipo receptor retardado poco acusado en lugar de un fenotipo insensible grave. Repita este análisis para todas las mutaciones. (Hay más de una explicación posible, sea creativo!)

32. El riesgo de padecer cáncer de piel es casi igual al de todos los otros tipos de cáncer combinados. A continuación se muestra una gráfica (modificada de Kraemer. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 94:11-14), en que se muestra la edad de aparición de cáncer de piel en pacientes con XP y sin XP, en la que el porcentaje relativo de cáncer de piel se ha graficado con respecto a la edad. La curva de los afectados de XP se basa en 29.757 cánceres tratados por el Instituto Nacional del Cáncer, y la curva de los afectados de XP se basa en 63 cánceres de piel del registro de Xeroderma Pigmentosum. (a) Resuma la información de la gráfica. (b) Explique por qué las personas afectadas de XP muestran una edad tan temprana de aparición.



LECTURAS SELECCIONADAS

Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E. 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mut. Res.* 31:347-64.

Bates, G., and Leharch, H. 1994. Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease. *BioEssays* 16:277-84.

Becker, M.M., and Wang, Z. 1989. Origin of ultraviolet damage in DNA. *J. Mol. Biol.* 210:429-38.

Cairns, J., Overbaugh, J., and Miller, S. 1988. The origin of mutants. *Nature* 335:142-45.

Cleaver, J.E. 1990. Do we know the cause of xeroderma pigmentosum? *Carcinogenesis* 11:875-82.

Cohen, S.N., and Shapiro, J.A. 1980. Transposable genetic elements. *Sci. Am.* (Feb.) 242:40-49.

Comfort, N.C. 2001. *The tangled field: Barbara McClintock's search for the patterns of genetic control*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Crow, J.F., and Denniston, C. 1985. Mutation in human populations. *Adv. Hum. Genet.* 14:59-216.

Den Dunnen, J.T., et al. 1989. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 45:835-47.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. 1995. *DNA repair and mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press.

Hall, B.G. 1990. Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics* 126:5-16.

Jiricny, J. 1998. Eukaryotic mismatch repair: An update. *Mutation Research* 409:107-21.

Knudson, A.G. 1979. Our load of mutations and its burden of disease. *Am. J. Hum. Genet.* 31:401-13.

Landers, E.S. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Little, J.W., and Mount, D.W. 1982. The SOS regulatory system of *E. coli*. *Cell* 29:11-22.

Massie, R., and Massie, S. 1975. *Journey*. New York: Knopf.

MacDonald, M.E., et al. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable in Huntington's disease chromosome. *Cell* 72:971-80.

McClintock, B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21:197-216.

Miki, Y. 1998. Retrotransposal integration of mobile genetic elements in human disease. *J. Human Genet.* 43:77-84.

Nickoloff, J.A. and Hoekstra, M.F., eds. 2001. *DNA damage and repair*, Vol. III: *Advances from phage to humans*. Totowa, NJ: Humana Press.

O'Hare, K. 1985. The mechanism and control of *P* element transposition in *Drosophila*. *Trends Genet.* 1:250-54.

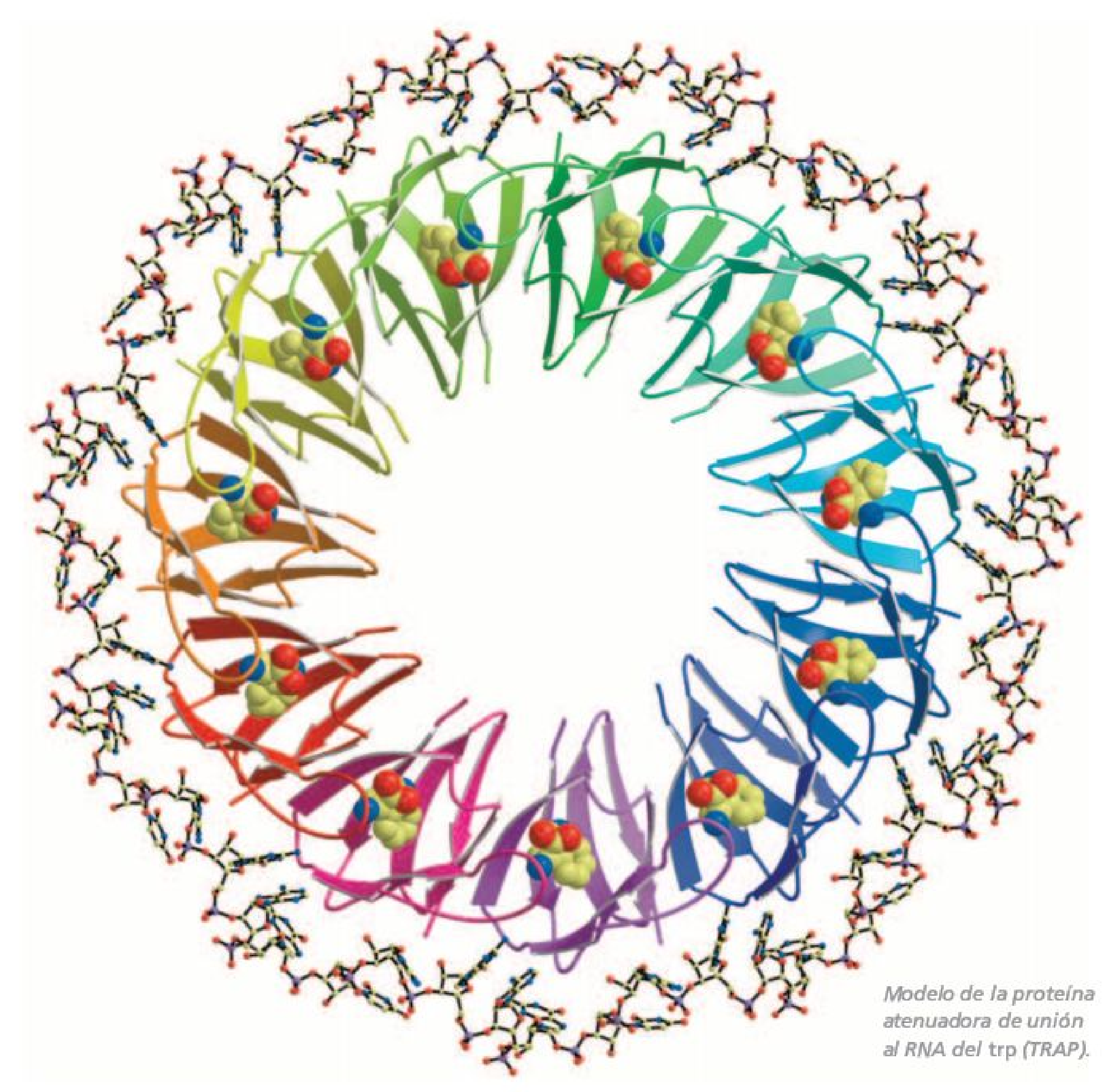
Radman, M., and Wagner, R. 1988. The high fidelity of DNA duplication. *Sci. Am.* (Aug.) 259:40-46.

Topal, M.D., and Fresco, J.R. 1976. Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature* 263:285-89.

Wells, R.D. 1994. Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *J. Biol. Chem.* 271:2875-78.

Yamamoto, F., et al. 1990. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345:229-33.

Regulación de la expresión génica en procariotas



Modelo de la proteína atenuadora de unión al RNA del trp *(TRAP).*

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- En las bacterias, la regulación de la expresión génica está a menudo relacionada con las necesidades metabólicas de la célula.
- La expresión eficiente de la información genética en las bacterias depende de complicados mecanismos reguladores que ejercen su control sobre la transcripción.
- Los mecanismos que regulan la transcripción se agrupan según ejerzan un control positivo o negativo sobre la expresión génica.
- Los genes que codifican enzimas para funciones relacionadas acostumbran a organizarse en grupos, y a menudo se controlan de manera coordinada en una única unidad denominada operón.
- La transcripción de los genes de un operón es inducible o reprimible.
- A menudo, el producto metabólico final de las rutas biosintéticas sirve de inductor o de represor de la expresión génica.

En capítulos anteriores se estableció cómo el DNA se organiza en genes, cómo los genes almacenan la información genética, y cómo se expresa esta información. Ahora consideraremos una de las preguntas más importantes de la genética molecular: *¿cómo se regula la expresión genética*? La prueba que apoya la idea de que los genes pueden activarse y desactivarse es muy convincente. El análisis detallado de las proteínas de *Escherichia coli* ha demostrado que las concentraciones de las aproximadamente 4000 cadenas polipeptídicas codificadas por su genoma varían enormemente. De algunas proteínas solo hay de 5 a 10 moléculas por célula, mientras que de otras, como las proteínas ribosómicas y muchas de las proteínas implicadas en la ruta glucolítica, hay hasta 100.000 copias por célula. Aunque en procariotas hay continuamente un nivel basal (unas pocas copias) de la mayoría de productos génicos, este nivel se puede incrementar dramáticamente. Esto indica claramente que deben existir mecanismos reguladores fundamentales que controlen la expresión de la información genética.

En este capítulo exploraremos lo que se conoce de la regulación de la expresión genética en bacterias. Como hemos visto en diversos capítulos anteriores, estos organismos son unos excelentes modelos para la investigación en muchos campos de la genética molecular. Las bacterias han sido organismos especialmente útiles para la investigación por diversos motivos. En primer lugar, sus ciclos vitales son extremadamente cortos. Literalmente, en una noche de cultivo se pueden producir centenares de generaciones, que generan miles de millones de bacterias o fagos genéticamente idénticos. También pueden estudiarse «cultivos puros», en los que se pueden aislar e investigar independientemente cepas mutantes de bacterias genéticamente únicas.

Para este tema es importante destacar que las bacterias también han sido un excelente sistema modelo para los estudios sobre la inducción de la transcripción genética en respuesta a cambios de las condiciones ambientales. Recuerde que en las bacterias también se produce regulación postranscripcional. Sin embargo, aplazaremos la discusión de este nivel de regulación hasta el siguiente capítulo, en el que consideraremos la regulación en los eucariotas.

16.1 Los procariotas tienen mecanismos genéticos eficientes para responder a las condiciones ambientales

La regulación de la expresión génica se ha investigado extensamente en procariotas, especialmente en *E. coli*. Se ha encontrado que se han desarrollado eficientes mecanismos genéticos que activan y desactivan los genes en función de las necesidades metabólicas de la célula de los respectivos productos génicos. Las bacterias no sólo responden a los cambios ambientales, sino que también regulan la actividad génica implicada en diversas respuestas celulares normales (que incluyen la replicación, la recombinación y la reparación de su DNA), en la división celular y en el desarrollo.

La idea de que los microorganismos regulan la síntesis de productos génicos no es nueva. En 1900 ya se demostró que cuando hay lactosa (un disacárido que contiene galactosa y glucosa) en el medio de cultivo de levaduras, estos organismos producen enzimas específicas del metabolismo de la lactosa. Cuando no hay lactosa, las enzimas no se producen. Poco después los investigadores pudieron generalizar que las bacterias se adaptan al ambiente produciendo determinadas enzimas solo cuando hay substratos específicos. Estas enzimas se denominaron **adaptativas** (a veces también se denominaros facultativas). En cambio, las enzimas que se producen continuamente, sea cual sea la composición química del ambiente, se denominaron **constitutivas**. Desde entonces, la palabra *adaptativo* se ha reemplazado por otra más precisa, **inducibles**, lo que refleja la función del substrato, que sirve de **inductor** de su producción.

Investigaciones más recientes han revelado un sistema opuesto, en el que la presencia de una molécula específica inhibe la expresión genética. Esto es generalmente cierto en las moléculas que son productos finales de rutas biosintéticas anabólicas. Por ejemplo, las células bacterianas pueden sintetizar el aminoácido triptófano. Si hay un suministro suficiente de este aminoácido en el ambiente o en el medio de cultivo, no es energéticamente rentable para la célula sintetizar las enzimas necesarias para la producción de triptófano. Así pues, se ha desarrollado un mecanismo mediante el que el triptófano desempeña una función en la represión de la transcripción del RNA esencial para la producción de las enzimas biosintéticas apropiadas. Al revés que el sistema inducible que controla el metabolismo de la lactosa, se dice que el que dirige la síntesis de triptófano es **reprimible**.

Tanto si la regulación es inducible como reprimible, puede estar bajo **control positivo** y **negativo**. En el caso de control negativo, la expresión genética se produce siempre *a menos que sea desconectada por algún tipo de molécula reguladora*. En cambio, en el control positivo, la transcripción se produce *solo si una molécula reguladora estimula directamente la producción de RNA*. En teoría, los dos tipos de control pueden dirigir sistemas inducibles y reprimibles. La discusión de las sucesivas secciones de este capítulo ayudará a clarificar estos sistemas opuestos de regulación. Para las enzimas implicadas en la lactosa y el triptófano, el control que opera es negativo.

16.2 El metabolismo de la lactosa en *E. coli* está regulado por un sistema inducible

La acumulación de pruebas genéticas y bioquímicas de la regulación del metabolismo de la lactosa empezó en 1946 con

los estudios de Jacques Monod, y continuó durante la siguiente década con las importantes contribuciones de Joshua Lederberg, François Jacob y Andre L'woff. Estas investigaciones proporcionaron ideas de cómo se reprime la actividad génica cuando no hay lactosa en el medio, y de cómo se induce cuando se dispone de ella. En presencia de lactosa, la concentración de la enzima responsable de su metabolismo incrementa rápidamente de unas pocas moléculas por célula a miles de ellas. La enzima responsable del metabolismo de la lactosa es *inducible*, y la lactosa es su *inductor*.

En procariotas, los genes que codifican enzimas con funciones relacionadas (p.e., todos los genes implicados en el metabolismo de la lactosa) tienden a estar organizados en grupos, y a menudo se encuentran bajo el control genético coordinado de una única unidad reguladora. Esta unidad está casi siempre localizada corriente arriba del grupo génico que controla, y como vimos al discutir la transcripción (Capítulo 13), nos referimos a ella como **sitio de actuación en *cis***. Las interacciones en este sitio implican la unión de moléculas que controlan la transcripción del grupo génico. Estas moléculas se denominan **elementos de actuación en *trans***. Las interacciones en los sitios de regulación determinan si los genes se expresan o no, y por lo tanto si están presentes los correspondientes enzimas o productos génicos. La unión de un elemento de actuación en *trans* a un sitio de actuación en *cis* puede regular el grupo génico tanto de forma negativa (desconectando los genes) como positiva (conectando los genes del grupo). En esta sección expondremos cómo se regulan coordinadamente estos grupos génicos bacterianos.

El descubrimiento que el gen regulador y el sitio de regulación forman parte del grupo génico tuvo una importancia capital para entender cómo se controla la expresión génica en este sistema. Ninguno de estos elementos reguladores codifica ninguna de las enzimas necesarias para el metabolismo de la lactosa, que es la función de los tres genes del grupo. Como se muestra en la Figura 16.1, los tres genes estructurales y el sitio regulador adyacente constituyen el **operón lactosa**, u **operón *lac***. En conjunto, el grupo completo funciona de manera integrada para proporcionar una respuesta rápida a la presencia y a la ausencia de lactosa.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué prueba estableció que la lactosa es el inductor de un gen cuyo producto está relacionado con el metabolismo de la lactosa?

Los genes estructurales

Los genes que codifican la estructura primaria de las enzimas se denominan **genes estructurales**. El operón *lac* tiene tres genes estructurales. El gen *lacZ* codifica la **β-galactosidasa**, una enzima cuya función principal es convertir el disacárido lactosa en los monosacáridos glucosa y galactosa (Figura 16.2). Esta conversión es esencial para que la lactosa pueda servir de fuente de energía primaria en la glucólisis. El segundo gen, *lacY*, codifica la estructura primaria de la **permeasa**, una enzima que facilita la entrada de lactosa en la célula bacteriana. El ter-

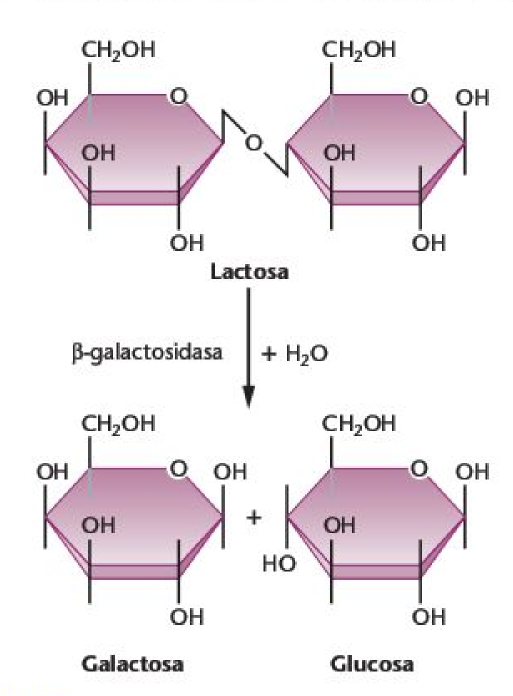


FIGURA 16.2 Conversión catabólica del disacárido lactosa en los monosacáridos que la forman, la galactosa y la glucosa.).

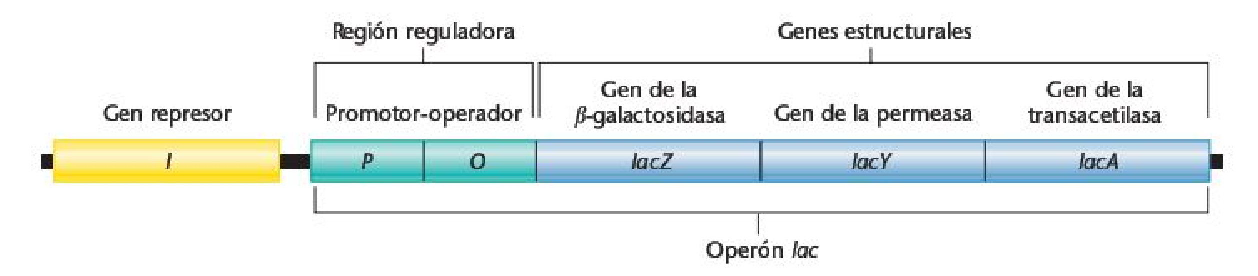


FIGURA 16.1 Resumen simplificado del grupo génico y de las unidades reguladoras implicadas en el control del metabolismo de la lactosa. (Esta región del DNA no está representada a escala.) A continuación en este mismo capítulo se muestra un modelo más detallado. (Véase la Figura 16.10.)

cer gen, *lacA*, codifica la enzima **transacetilasa**. Si bien su función fisiológica no se conoce completamente, puede estar implicada en la eliminación de la célula de los subproductos tóxicos de la digestión de la lactosa.

Para estudiar los genes que codifican estas tres enzimas, los investigadores aislaron muchas mutaciones que eliminan la función de una u otra de estas enzimas. Joshua Lederberg fue el primero en aislar y examinar estos mutantes lac^-. Las células mutantes que no pueden producir β-galactosidasa ($lacZ^-$) o permeasa ($lacY^-$) activas son incapaces de utilizar la lactosa como fuente de energía. También se encontraron mutaciones en el gen de la transacetilasa. Experimentos de cartografía realizados por Lederberg establecieron que los tres genes están estrechamente unidos o son contiguos entre sí, siguiendo el orden Z-Y-A (véase la Figura 16.1).

Hay otra observación importante para lo que se descubrió de estos genes estructurales. El conocimiento de que estaban uno al lado de otro condujo al descubrimiento de que los tres genes se transcriben como una sola unidad, lo que resulta en un mRNA policistrónico (Figura 16.3). En consecuencia, los tres genes se regulan coordinadamente ya que un solo mensajero sirve de base para la traducción de los tres productos génicos.

El descubrimiento de las mutaciones de regulación

¿Cómo activa la lactosa los genes estructurales, y cómo induce la síntesis de las enzimas relacionadas? El descubrimiento y el análisis de los **inductores gratuitos**, unos análogos químicos de la lactosa como el análogo que contiene azufre **isopropiltiogalactósido (IPTG)**, que se muestra en la Figura 16.4, proporciona una respuesta parcial. Los inductores gratuitos se comportan como los inductores naturales, pero no sirven de substrato para las enzimas que se sintetizan. Su descubrimiento proporciona una prueba sólida de que la inducción inicial *no* depende de la interacción entre el inductor y la enzima.

¿Cuál es, pues, la función de la lactosa en la inducción? La respuesta a esta pregunta requiere el examen de un tipo de mutaciones denominadas **mutaciones constitutivas**. En este tipo de mutantes, las enzimas se producen independientemente de la presencia o ausencia de lactosa. Los mapas del primer tipo de mutaciones constitutivas, denominadas $lacI^-$, muestran que se localizan en un sitio del DNA cercano al de los genes estructurales, pero distinto a ellos. El gen *lacI* se denomina **gen represor**. Hay un segundo conjunto de mutaciones que producen los mismos efectos y que está situado en una región adyacente a los genes estructurales. Este tipo de mutaciones, denominadas $lacO^C$, identifican la **región operadora** del operón. Puesto que en estos dos tipos de mutaciones constitutivas se ha eliminado la capacidad de inducción (las enzimas se producen continuamente), los cambios genéticos han alterado la regulación.

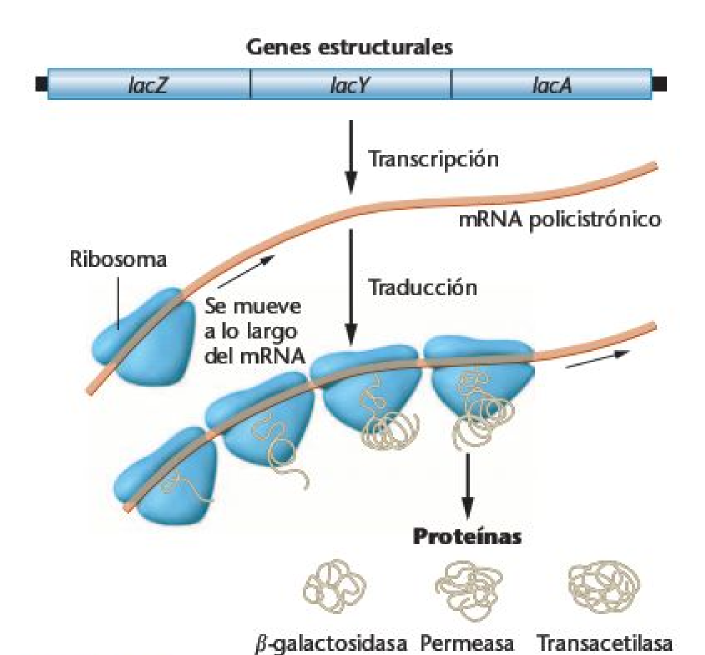


FIGURA 16.3 Los genes estructurales del operón *lac* se transcriben en un solo mRNA policistrónico, que es traducido simultáneamente por diversos ribosomas en las tres enzimas codificadas por el operón.

El modelo del operón: control negativo

En 1960, Jacob y Monod propusieron un diseño de control negativo de la regulación denominado **modelo del operón**, en el que un grupo de genes se regula y se expresa como una unidad. Como se vio en la Figura 16.1, el operón *lac* está formado por los genes estructurales *Z*, *Y* y *A*, y por las secuencias adyacentes de DNA conocidas como *región operadora*. Estos científicos argumentaron que el gen *lacI* regula la transcripción de los genes estructurales produciendo una **molécula represora**, y que el represor es **alostérica**, lo que significa que es una molécula que puede interaccionar con otra de manera reversible, provocando un cambio conformacional de su forma tridimensional y un cambio en su actividad química. La Figura 16.5 muestra los componentes del operón *lac* y la acción del represor de *lac* en presencia y en ausencia de lactosa.

Jacob y Monod sugirieron que el represor interacciona normalmente con la secuencia de DNA de la región operadora.

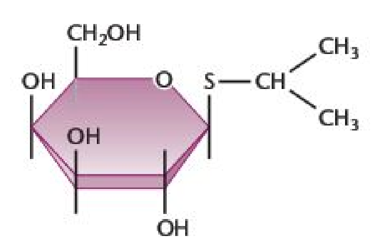


FIGURA 16.4 El inductor gratuito isopropiltiogalactósido (IPTG).

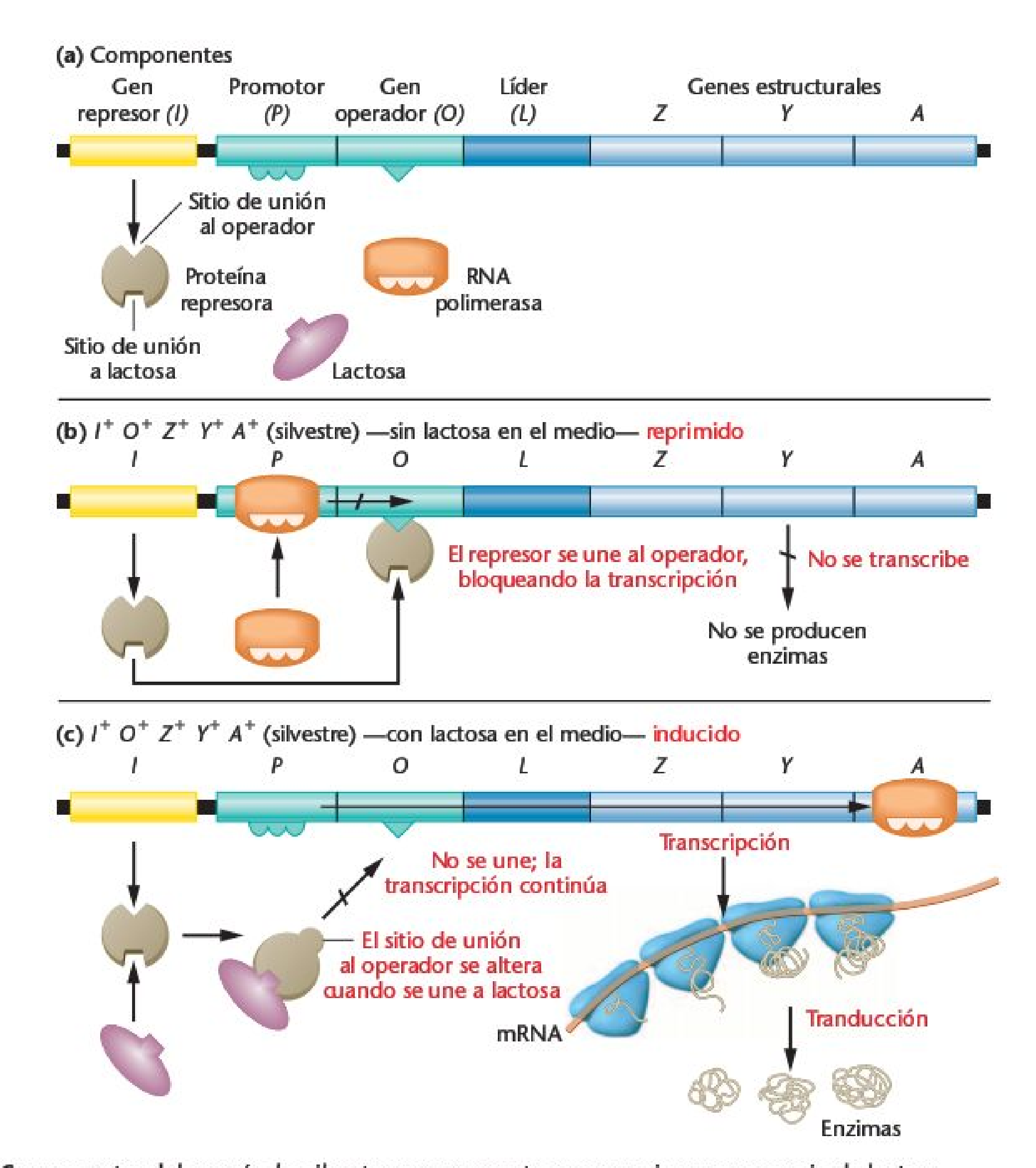


FIGURA 16.5 Componentes del operón *lac* silvestre y su respuesta en ausencia y en presencia de lactosa.

Cuando está interaccionando, inhibe la acción de la RNA polimerasa, reprimiendo la transcripción de los genes estructurales [Figura 16.5(b)]. Sin embargo, cuando hay lactosa presente, este azúcar se une al represor, provocando el cambio alostérico conformacional. Este cambio altera el sitio de unión del represor, haciendo que no pueda interaccionar con el operador del DNA [Figura 16.5(c)]. En ausencia de la interacción represor-operador, la RNA polimerasa transcribe los genes estructurales, y se producen las enzimas necesarias para el metabolismo de la lactosa. Puesto que la transcripción se produce solo cuando el represor *no* se une a la región operadora, se dice que la regulación se encuentra bajo *control negativo*.

El modelo del operón utiliza estas posibles interacciones moleculares para explicar la regulación eficiente de los genes estructurales. En ausencia de lactosa no se necesitan las enzimas codificadas por estos genes, y por eso se reprimen. Cuando hay lactosa, ésta induce indirectamente la activación de los genes uniéndose al represor[1]. Si se metaboliza toda la lactosa, no queda lactosa para unirse al represor, el cual puede unirse otra vez al DNA operador para reprimir la transcripción.

Las mutaciones constitutivas I^- y O^C interfieren con estas interacciones moleculares, lo que permite la transcripción continua de los genes estructurales. En los mutantes I^-, que se ven en la Figura 16.6(a), el producto represor está alterado y no puede unirse a la región operadora, por lo que los genes estructurales están siempre activados. En el caso del mutante O^C

[1] Técnicamente, el inductor es la alolactosa, un isómero de la lactosa. Cuando la lactosa entra en la célula bacteriana, la enzima β-galactosidasa convierte parte de la lactosa en alolactosa.

Nota del traductor: se puede producir alolactosa a pesar de que aún no se haya inducido la síntesis de las enzimas necesarias puesto que siempre hay un nivel basal de expresión (véase el inicio de este capítulo).

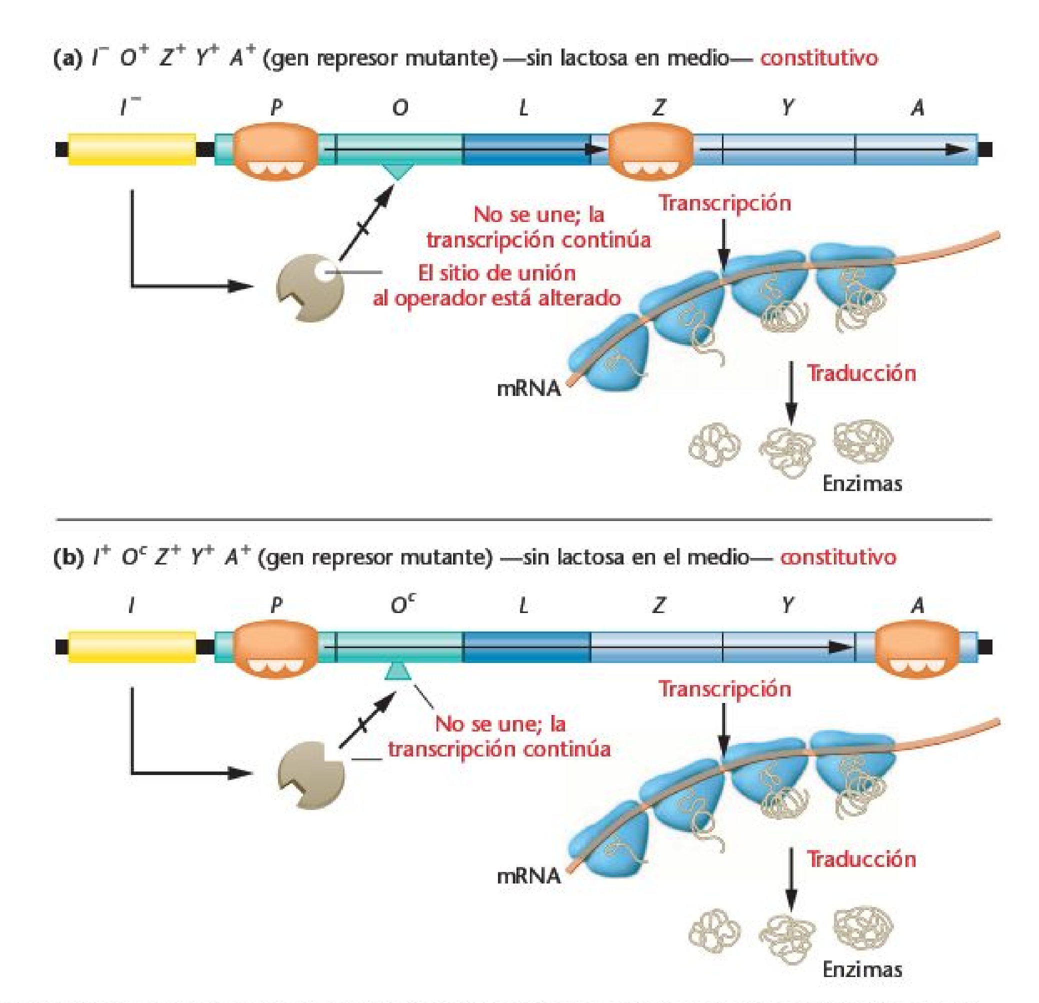


FIGURA 16.6 Respuesta del operón *lac* en ausencia de lactosa cuando la célula tiene una mutación I^- u O^C.

[Figura 16.6(c)], la secuencia nucleotídica del DNA operador está alterada y no puede unir la molécula represora normal. El resultado es el mismo: los genes estructurales se transcriben continuamente.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿En qué observaciones experimentales se basa la predicción de que se produce una molécula represora que regula el operón *lac*?

La prueba genética del modelo del operón

El modelo del operón es especialmente bueno ya que conduce a tres predicciones importantes que pueden comprobarse para determinar su validez. Las predicciones más importantes que deben examinarse son: (1) el gen *I* produce un producto celular difusible; (2) la región *O* está implicada en la regulación, pero no produce ningún producto; y (3) la región *O* debe ser adyacente a los genes estructurales para poder regular su transcripción.

La construcción de bacterias parcialmente diploides permite evaluar estas suposiciones, especialmente las que predicen la presencia de elementos reguladores de actuación en *trans*. Por ejemplo, como se introdujo en el Capítulo 6, el plásmido F puede contener genes cromosómicos, en cuyo caso se denomina F′. Cuando una célula F^+ adquiere uno de estos plásmidos, contiene su propio cromosoma y uno o más genes adicionales presentes en el plásmido. El uso de estos plásmidos hace que sea posible, por ejemplo, introducir un gen I^+ en una célula huésped cuyo genotipo sea I^-, o introducir una región O^+ a una célula huésped de genotipo O^C. El modelo del operón de Jacob-Monod predice cómo se verá afectada la regulación en estas células. La adición de un gen I^+ a una célula I^- debería restaurar la capacidad de inducción, ya que el gen I^+ insertado produciría el represor silvestre normal, que es un factor de actuación en *trans*. La adición de una región O^+ a una célula O^C no debería tener ningún efecto en la producción constitutiva de las enzimas, ya que la regulación depende de una región O^+ inmediatamente adyacente a los genes estructurales; es decir, O^+ es un regulador de actuación en *cis*.

En la Tabla 16.1 se muestran los resultados de estos experimentos, donde *Z* representa los genes estructurales. Los

TABLA 16.1 **COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD GÉNICA (+ O −) EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE LACTOSA PARA DIVERSOS GENOTIPOS DE *E. COLI***

		Presencia de actividad β-galactosidasa	
	Genotipo	Presencia de lactosa	Ausencia de lactosa
	$I^+O^+Z^+$	+	−
A.	$I^+O^+Z^-$	−	−
	$I^-O^+Z^+$	+	+
	$I^+O^CZ^+$	+	+
B.	$I^-O^+Z^+/F'I^+$	+	−
	$I^+O^CZ^+/F'O^+$	+	+
C.	$I^+O^+Z^+/F'I^-$	+	−
	$I^+O^+Z^+/F'O^C$	+	−
D.	$I^SO^+Z^+$	−	−
	$I^SO^+Z^+/F'I^+$	−	−

Nota: en las partes B, C y D, la mayoría de genotipos son diploides parciales, que contienen un factor F con genes unidos (F′).

genes insertados se enumeran después de la denominación F′. Los resultados de los dos experimentos que se acaban de describir son congruentes con el modelo de Jacob-Monod (parte B de la Tabla 16.1). La parte C muestra los experimentos recíprocos, en los que se añade un gen I^- o un gen O^C a células con el fenotipo inducible normal. Como el modelo predice, estos diploides parciales mantienen la capacidad de inducción.

Otra predicción del modelo del operón es que determinadas mutaciones del gen *I* deberían tener el efecto opuesto a I^-. Es decir, que este otro tipo de moléculas represoras mutantes, en vez de ser constitutivas por falta de interacción con el operador, no deberían poder interaccionar con el inductor, la lactosa. En consecuencia, el represor siempre estaría unido a la secuencia operadora, y los genes estructurales estarían permanentemente reprimidos (Figura 16.7). Si fuese así, la presencia de un gen I^+ adicional tendría un efecto muy pequeño en la represión o no tendría ninguno en absoluto.

De hecho, como se muestra en la parte D de la Tabla 16.1, se descubrió una mutación como la que se acaba de describir, denominada I^S, en la que el operón está «súper-reprimido». Un gen I^+ adicional no disminuye de manera efectiva la represión de la actividad génica. Estas observaciones son congruentes con la idea de que el represor contiene sitios alostéricos separados implicados en la regulación.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué prueba experimental apoya firmemente la predicción que una molécula represora regula la expresión génica en el operón *lac*?

Ahora resuelva esto

El Problema 16.6 de la página 469 le pide que prediga el resultado de la expresión génica en diversos genotipos y en distintas condiciones celulares.

Sugerencia: Primero determine si el represor es activo o inactivo en función de si el gen que lo codifica es silvestre o mutante. Después considere el impacto de la presencia o ausencia de lactosa.

El aislamiento del represor

Aunque la teoría del operón de Jacob y Monod explicó satisfactoriamente muchos de los aspectos de la regulación genética en procariotas, cuando en 1961 se publicó este histórico artículo aún no se conocía la naturaleza de la molécula represora. Aunque supusieron que el represor alostérico era una proteína, el RNA también era un posible candidato puesto que la actividad de la molécula precisaba de la capacidad de unirse a DNA. A pesar de los muchos intentos de aislar y caracterizar la hipotética molécula represora, no se obtuvo ninguna prueba inmediata. Una sola célula de *E. coli* no contiene más de 10 moléculas represoras de *lac*; la identificación química directa de 10 moléculas dentro de una población de millones de pro-

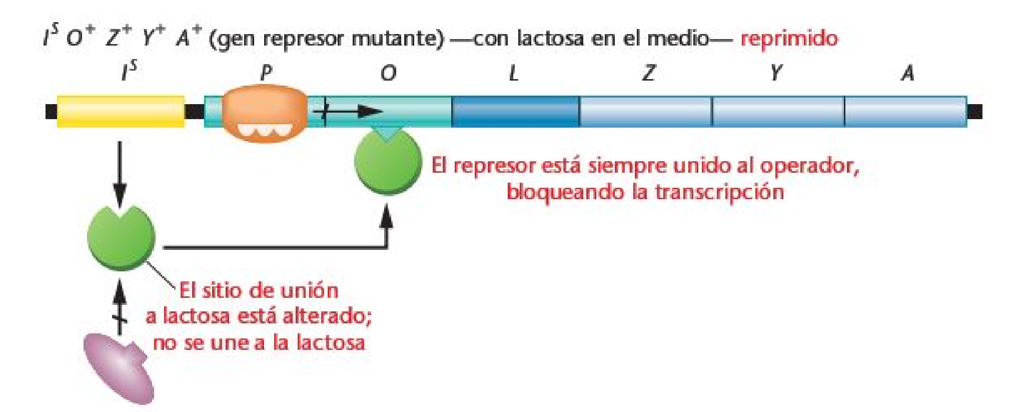


FIGURA 16.7 Respuesta del operón *lac* en presencia de lactosa cuando la célula tiene una mutación I^S.

teínas y RNAs presentes en una sola célula es un desafío tremendo.

En 1966, Walter Gilbert y Benno Müller-Hill comunicaron el aislamiento del represor de *lac* en forma parcialmente purificada. Para conseguir aislarlo, utilizaron una cepa mutante *reguladora de la cantidad* (I^q) que contiene unas 10 veces más represor que las células silvestres de *E. coli*. La utilización del inductor gratuito IPTG, que se une al represor, y la utilización de la técnica de **diálisis de equilibrio**, también contribuyeron al aislamiento del represor. En esta técnica, se colocaron extractos de células I^q en bolsas de diálisis hasta que alcanzaron el equilibrio con una solución externa de IPTG radioactivo, que es suficientemente pequeño como para difundirse libremente por la membrana de diálisis. Al alcanzar el equilibrio, la concentración de IPTG en el interior de la bolsa era superior a la concentración de la solución exterior, lo que indicaba que en el extracto celular había algún material que unía IPTG y que este material era suficientemente grande como para no difundirse por la membrana de la bolsa.

Finalmente se purificó el material que unía IPTG, y se demostró que tenía las diversas características de las proteínas. En cambio, extractos de células I^- con expresión constitutiva por ausencia de *actividad* represora de *lac* no presentaban ninguna unión a IPTG, lo que sugirió firmemente que la proteína aislada era la molécula represora.

Para demostrarlo, Gilbert y Müller-Hill hicieron crecer células de *E. coli* en un medio que contenía azufre radioactivo, y después aislaron la proteína de unión a IPTG, cuyos aminoácidos que contienen azufre estaban marcados. Esta proteína se mezcló con DNA de una cepa del fago lambda (λ) que contenía el gen $lacO^+$. El DNA sedimentó a 40*S*, mientras que la proteína de unión a IPTG sedimentó a 7*S*. Una vez mezclados, se sedimentaron en un gradiente mediante ultracentrifugación. La proteína radioactiva sedimentó a la misma velocidad que el DNA, lo que indicó que esta proteína se une al DNA. Experimentos adicionales demostraron que la proteína de unión a IPTG, la proteína represora, se une sólo al DNA que contiene la región *lac*, y que no se une a un DNA *lac* que contenga una mutación constitutiva del operador (O^C).

Ahora resuelva esto

El Problema 16.8 de la página 470 le pide que describa cómo se aisló el represor de *lac*.

Sugerencia: Primero debe tener claro que la diálisis de equilibrio permite que las moléculas pequeñas como la lactosa o el inductor gratuito IPTG se muevan libremente en ambas direcciones a través de la membrana, mientras que las moléculas grandes como el represor no pueden atravesarla, permaneciendo en el mismo sitio durante todo el experimento.

16.3 La proteína activadora por catabolito (CAP) ejerce un control positivo sobre el operón *lac*

Como se hace evidente en la discusión anterior del operón *lac*, la función de la β-galactosidasa es cortar la lactosa en sus componentes, la glucosa y la galactosa. Después, para que la célula pueda usar la galactosa, ésta se transforma en glucosa. ¿Qué sucede cuando la célula se encuentra en un ambiente que contiene grandes cantidades de lactosa *y* de glucosa? No sería energéticamente eficiente para la célula que la lactosa le «indujese» a hacer β-galactosidasa, puesto que lo que la célula necesita, la glucosa, ya está presente. Como veremos a continuación, hay otro componente molecular implicado en la represión efectiva de la expresión del operón *lac* cuando hay glucosa presente, la denominada **proteína activadora por catabolito (CAP)**. Esta inhibición, denominada **represión por catabolito**, es el reflejo de la mayor facilidad con la que la glucosa puede metabolizarse si se compara con la lactosa. Las células «prefieren» glucosa, y si ésta está presente, no activan el operón *lac*, aún cuando también dispongan de lactosa.

Para entender la CAP y su función en la regulación, retrocedamos un momento. Cuando el represor de *lac* está unido al inductor, el operón *lac* se activa y la RNA polimerasa transcribe los genes estructurales. Como se dijo en el Capítulo 13, la transcripción se inicia como resultado de la unión entre la RNA polimerasa y la secuencia nucleotídica de la **región promotora**, que se encuentra corriente arriba (5′) de la secuencia codificante inicial. En el operón *lac*, el promotor se encuentra entre el gen *I* y la región operadora (*O*). (Véase la Figura 16.1.) Análisis minuciosos han revelado que la unión de la polimerasa no es nunca muy eficiente a menos que CAP esté presente para facilitar el proceso.

En la Figura 16.8 se resume este mecanismo. En ausencia de glucosa y en condiciones de inducción, CAP ejerce un **control positivo** uniéndose al sitio de unión de CAP, lo que facilita que la RNA polimerasa se una al promotor y, en consecuencia, facilita la transcripción. Por lo tanto, para que la tasa de transcripción sea máxima, el represor debe estar unido a la lactosa (para que no reprima la expresión del operón), *y* CAP debe estar unido al sitio de unión de CAP.

Esto conduce a la pregunta central sobre la CAP. ¿Qué función desempeña la glucosa en la inhibición de la unión de CAP cuando ésta se encuentra presente? La respuesta implica a otra molécula, el **monofosfato de adenosina cíclico (cAMP)**, de la que depende la unión de CAP. Para que se produzca la unión al promotor, CAP debe estar unido a cAMP. El nivel de cAMP depende de una enzima, la **adenil ciclasa**, que cataliza la conversión de ATP a cAMP[2]. (Véase la Figura 16.9).

---

[2] Por su relación con el cAMP, la CAP también se denomina proteína receptora de AMP cíclico (CRP), i y el gen que la codifica se denomina *crp*. Puesto que el primer nombre que se dio a esta proteína fue CAP, utilizaremos la nomenclatura inicial.

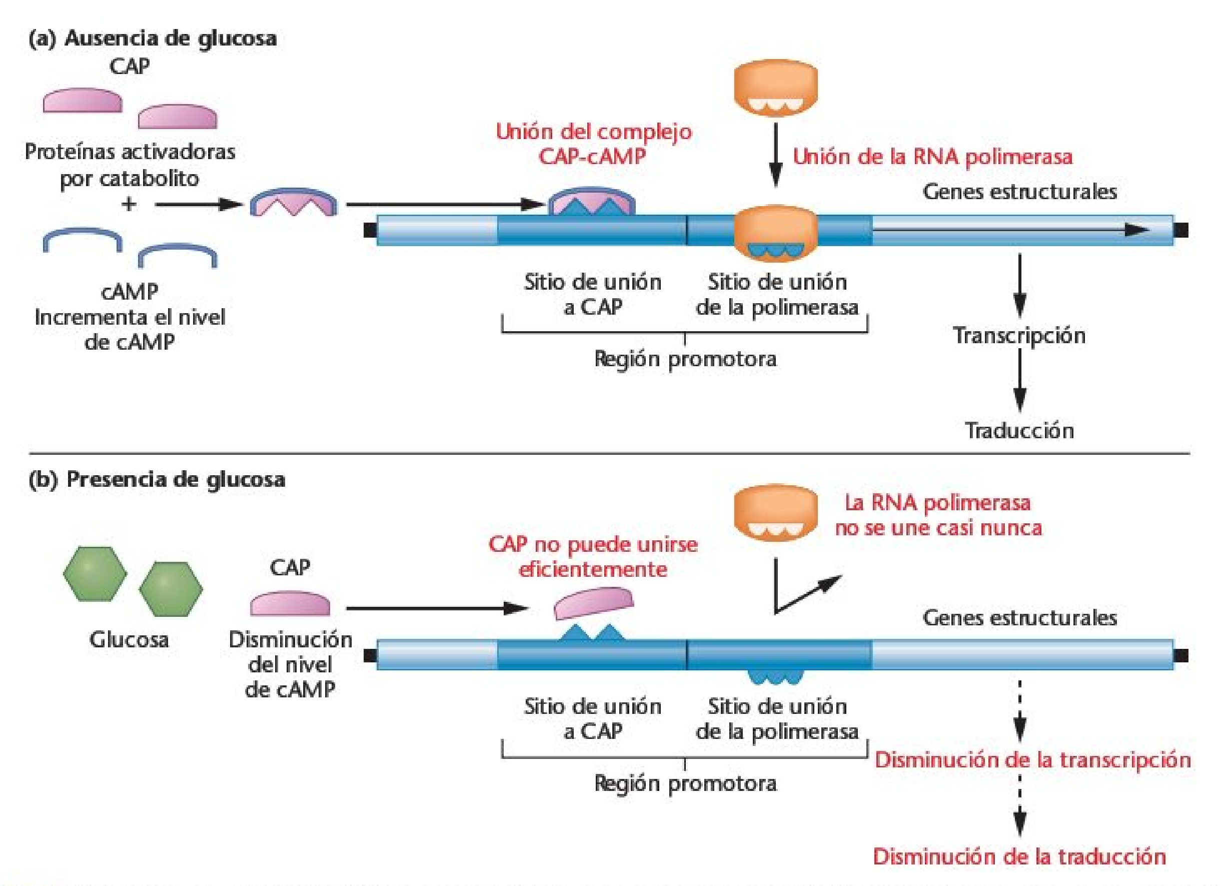


FIGURA 16.8 Represión por catabolito. (a) En ausencia de glucosa, los niveles de cAMP se incrementan, lo que resulta en la formación del complejo cAMP-CAP, que se une al sitio CAP del promotor, estimulando de la transcripción. (b) En presencia de glucosa, los niveles de cAMP decrecen, no se forma el complejo cAMP-CAP, y no se estimula la transcripción.

La función de la glucosa en la represión por catabolito es obvia. Ésta inhibe la actividad de la adenil ciclasa, lo que provoca la disminución del nivel de cAMP en la célula. En estas condiciones, CAP no puede formar el complejo CAP-cAMP, que es esencial para el control positivo de la transcripción.

Como el represor de *lac*, CAP y cAMP-CAP se han examinado mediante cristalografía de rayos X. CAP es un dímero que se inserta en las regiones adyacentes de la secuencia nucleotídica específica del DNA que constituye el promotor. Cuando está unido al DNA, el complejo cAMP-CAP dobla esta molécula, haciendo que adquiera una nueva conformación.

FIGURA 16.9 Formación de cAMP a partir de ATP, catalizado por la adenil ciclasa.

Los experimentos de unión en solución han aclarado todavía más el mecanismo de activación génica. Por sí solos, ni el cAMP-CAP ni la RNA polimerasa tienen una gran afinidad para unirse al DNA del promotor de *lac*, y ni siquiera tienen una gran afinidad para unirse entre sí. Sin embargo, cuando las dos están juntas y en presencia del DNA del promotor de *lac*, se forma un complejo de unión compacto, lo que supone un ejemplo de lo que en términos bioquímicos se denomina **unión cooperativa**. En el caso de cAMP-CAP y del operón *lac*, este fenómeno ilustra el alto grado de especificidad implicado en la regulación genética de un sólo grupo pequeño de genes.

La regulación del operón *lac* mediante represión por catabolito conduce a una eficiente utilización de la energía, puesto que la presencia de glucosa reprimirá el metabolismo de la lactosa aunque la célula pueda disponer de ella. También se ha observado represión por catabolito que implica a CAP en otros operones inducibles, incluyendo los que controlan el metabolismo de la galactosa y la arabinosa.

Ahora resuelva esto

El Problema 16.10 de la página 470 le pide que valore el nivel de actividad génica del operón *lac* en función de diversas combinaciones de presencia o ausencia de lactosa y glucosa.

Sugerencia: Debe recordar que la regulación que implica la lactosa es un sistema de control negativo, mientras que la regulación que implica la glucosa es un sistema de control positivo.

16.4 El análisis de la estructura cristalina de los complejos represores ha confirmado el modelo del operón

Actualmente se tiene un conocimiento minucioso de la naturaleza bioquímica de la región reguladora del operón *lac*, habiéndose identificado las localizaciones relativas precisas de los diversos componentes (Figura 16.10). En 1996, Mitchell Lewis, Ponzy Lu, y sus colaboradores pudieron determinar la estructura cristalina del represor de *lac* y la estructura del represor unido al inductor y al DNA operador. En consecuencia, la información previa que se basaba en datos genéticos y bioquímicos se ha complementado actualmente con la interpretación estructural. En conjunto, actualmente se tiene una imagen casi completa de la regulación del operón.

El represor, que es el producto génico del gen *I*, es un monómero formado por 360 aminoácidos. Se ha identificado la región de unión al inductor de este monómero [Figura 16.11(a)]. El represor funcional contiene cuatro de estas unidades, lo que genera un tetrámero, si bien el dímero también se une. El tetrámero puede cortarse con una proteasa en condiciones controladas produciendo cinco fragmentos. Cuatro provienen de los extremos N-terminales del tetrámero, que se unen al DNA operador. El quinto fragmento es el núcleo restante del tetrámero, que proviene de los extremos COOH-terminales, y es el que se une a la lactosa y a los inductores gratuitos como IPTG. Su análisis ha revelado que, en un momento dado, cada tetrámero puede unirse a dos hélices de DNA operadoras simétricas [Figura 16.11(b)].

El DNA operador, definido inicialmente por análisis de mutaciones (*lacO*^{C}) y confirmado por análisis de secuenciación de DNA, se localiza corriente arriba del inicio de la secuencia codificante real del gen *lacZ*, justo a su lado. Los estudios cristalográficos muestran que la región real de unión al represor de este operador primario, denominado O_1, está formada por 21 pares de bases. Como se muestra en la Figura 16.10, se han identificado otras dos regiones operadoras auxiliares. Una de ellas, denominada O_2, se localiza a 401 pares de bases corriente abajo del operador primario, dentro del gen *lacZ*. La otra, denominada O_3, se encuentra a 93 pares de bases corriente arriba de O_1, justo encima del sitio CAP. *In vivo*, para que la represión sea máxima, los tres operadores deben estar unidos.

La unión del represor a dos sitios operadores distorsiona la conformación del DNA haciendo que éste se doble alejándose del represor. Cuando se genera un modelo que implica la

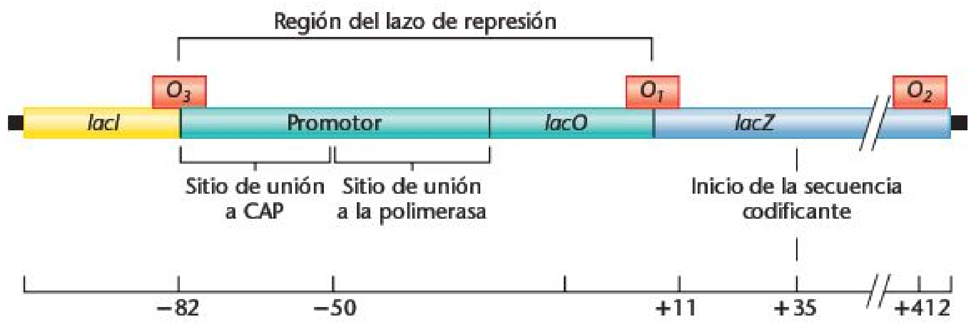


FIGURA 16.10 Esquema detallado de las diversas regiones reguladoras implicadas en el control de la expresión génica del operón lac, según se describe en el texto. Los números de la escala inferior representan los sitios nucleotídicos corriente arriba y corriente abajo del sitio de iniciación de la transcripción.

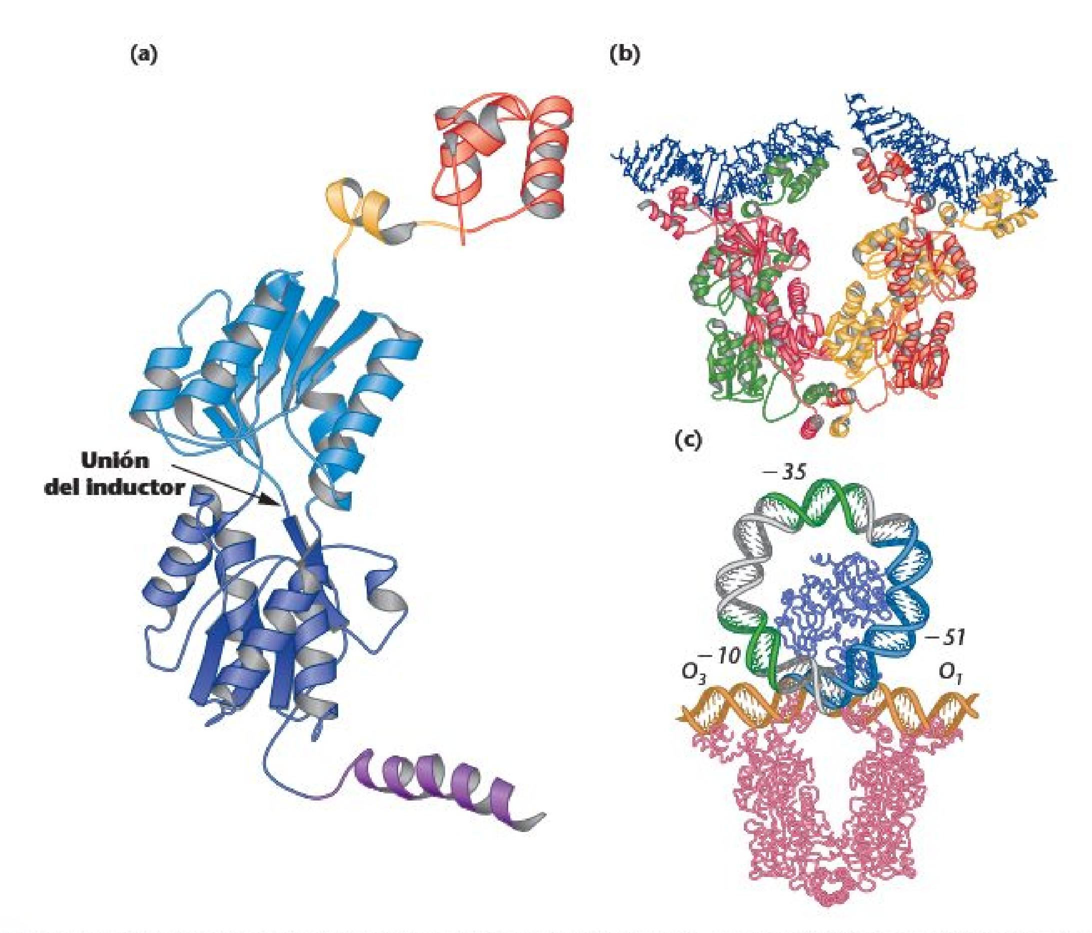


FIGURA 16.11 Modelos del represor de *lac* y su unión al sitio operador del DNA, según análisis de su estructura cristalina. (a) Monómero represor. La flecha indica el sitio de unión al inductor. La región de unión al DNA se muestra en color rojo. (b) Dímero represor unido a dos segmentos de 21 pares de bases del DNA operador (se muestra de color azul). (c) Represor y CAP (en color azul marino) unidos al DNA de *lac*. La unión a las regiones operadoras O_1 y O_3 genera un lazo de represión de 93 pares de bases del DNA promotor.

unión doble a los operadores O_1 y O_3 [Figura 16.11(c)], los 93 pares de bases de DNA que hay entre ellos sobresalen, formando lo que se denomina un **lazo de represión**. En este modelo, la región promotora que se une a la RNA polimerasa queda dentro del lazo, lo que evita que sea accesible durante la represión. Además, el lazo de represión posiciona el sitio de unión a CAP de tal manera que tras la inducción facilita la interacción de CAP con la RNA polimerasa. El hallazgo de la formación de lazos de DNA durante la represión es parecido a las transiciones que se predice que ocurren en los sistemas eucarióticos. (Véase el Capítulo 17.)

Estos estudios también han definido los cambios de conformación tridimensional que acompañan a las transiciones alostéricas que se producen durante la interacción con las moléculas inductoras. En conjunto, los estudios cristalográficos proporcionan un nivel nuevo de comprensión del proceso de regulación que se produce en el operón *lac*, y confirman los hallazgos y las predicciones del modelo que Jacob y Monod establecieron hace más de 40 años basándose estrictamente en datos genéticos.

16.5 El operón triptófano (*trp*) en *E. coli* es un sistema genético reprimible

Aunque hacía algún tiempo que se conocía el proceso de inducción, no fue hasta 1953 que Monod y sus colaboradores descubrieron un operón reprimible. *E. coli* silvestre puede producir las enzimas necesarias esenciales para la biosíntesis de aminoácidos así como de otras macromoléculas esenciales. Monod centró sus investigaciones en el aminoácido triptófano y en la enzima **triptófano sintetasa**, y descubrió que, si en el medio de cultivo hay una cantidad suficiente de triptófano, no se producen las enzimas necesarias para su síntesis. Energéticamente, la represión de los genes implicados en la síntesis de estas enzimas es muy económica para la célula cuando hay suficiente cantidad de triptófano.

Otras investigaciones demostraron que, en *E. coli*, para realizar la síntesis de triptófano, hay una serie de enzimas codificadas por cinco genes contiguos. Estos genes forman parte

de un operón y, en presencia de triptófano, todos ellos se reprimen de manera coordinada, sin que se produzca ninguna de estas enzimas. Debido a la gran semejanza entre esta represión y la inducción de enzimas en el metabolismo de la lactosa, Jacob y Monod propusieron un modelo de regulación génica análogo al del sistema *lac* (Figura 16.12).

Para justificar la represión, sugirieron la presencia de un *represor que normalmente es inactivo*, y que por sí solo no puede interaccionar con la región operadora del operón. Sin embargo, este represor es una molécula alostérica que se puede unir al triptófano. En presencia de este aminoácido, el complejo resultante represor-triptófano adquiere una nueva conformación que se une al operador, reprimiendo la transcripción. De esta manera, si hay triptófano, el producto final de esta ruta anabólica, el sistema se reprime y no se sintetizan las enzimas. Puesto que el complejo de regulación inhibe la transcripción del operón, este sistema reprimible se encuentra bajo control negativo. Y, puesto que el triptófano participa en la represión, dentro de este esquema de regulación a esta molécula se la conoce como **correpresor**.

Pruebas del operón *trp*

Pronto se dispuso de pruebas para el concepto de operón reprimible, que inicialmente se basaron en el aislamiento de dos tipos diferentes de mutaciones constitutivas. El primer tipo, denominado *trpR*$^{-}$, se sitúa a una distancia considerable de los genes estructurales. Este locus representa el gen que codifica

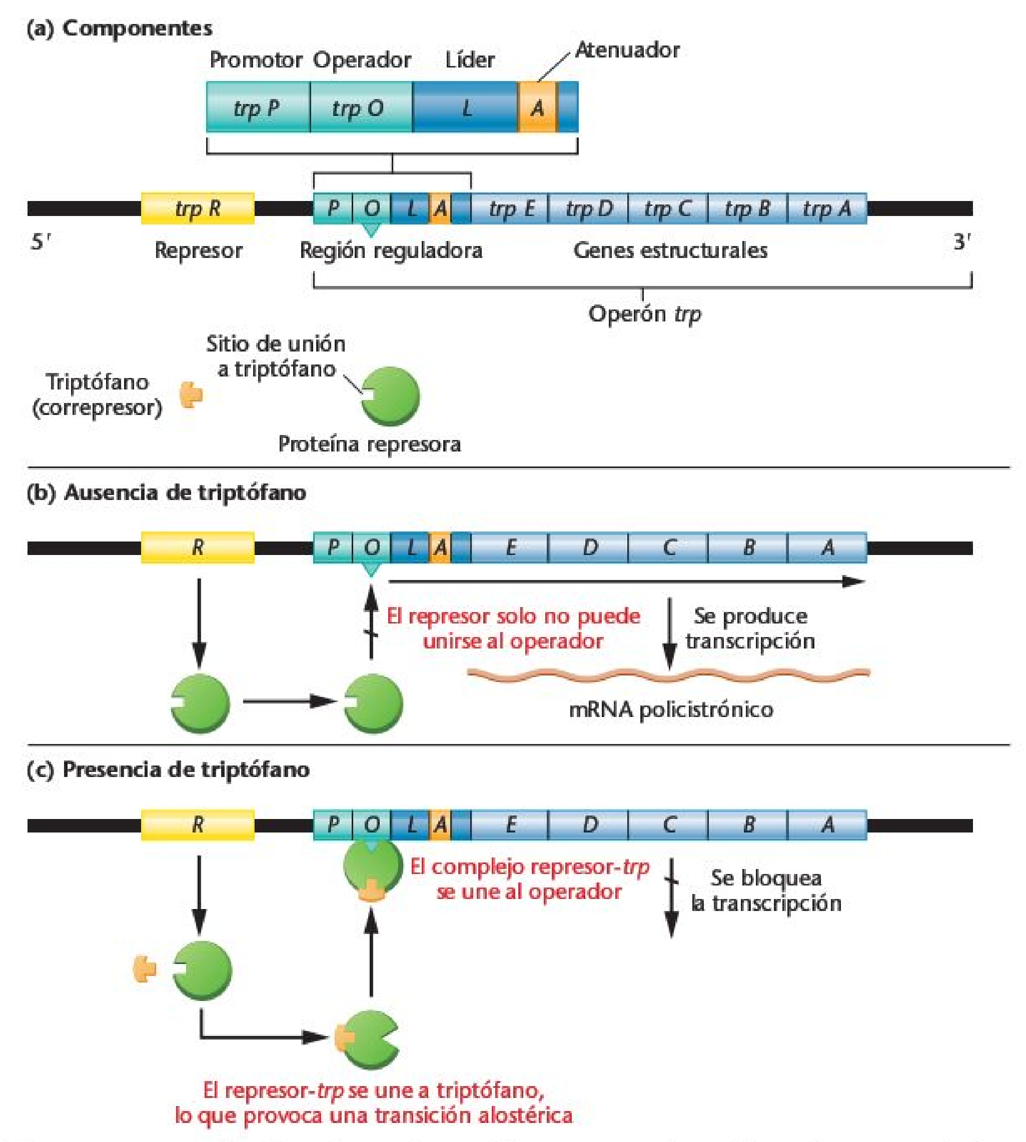


FIGURA 16.12 (a) Componentes implicados en la regulación del operón triptófano. (b) Condiciones reguladoras que implican la activación o (c) la represión de los genes estructurales. En ausencia de triptófano, se produce un represor inactivo que no se puede unir al operador (*O*), lo que permite que se produzca transcripción. En presencia de triptófano, éste se une al represor, causando una transformación alostérica. Este complejo se une a la región operadora, lo que reprime el operón.

el represor. Posiblemente, la mutación inhibe la interacción del represor con el triptófano o inhibe completamente la formación del represor. Sea como fuere, en las células mutantes *trpR*$^-$ no se produce nunca represión. Si se añade un gen *trpR*$^+$ adicional se restablece la represión, como se esperaría si este gen codificase para una molécula represora.

El segundo mutante constitutivo es análogo al del operador del operón lactosa, ya que se sitúa en un lugar inmediatamente adyacente a los genes estructurales. Además, la adición de un gen operador silvestre a las células mutantes (como elemento externo) no recupera la represión de las enzimas. Esto es lo que se predice si el operador mutante no puede interaccionar con el complejo represor-triptófano.

Actualmente se ha definido bien el operón *trp* completo, como se muestra en la Figura 16.12. Éste tiene cinco genes estructurales contiguos (*trpE*, *D*, *C*, *B*, y *A*) que se transcriben como un mensajero policistrónico que dirige la traducción de las enzimas que catalizan la biosíntesis del triptófano. Como el operón *lac*, este operón tiene una región promotora (*trpP*) que representa el sitio de unión para la RNA polimerasa, y una región operadora (*trpO*) a la que se une el represor. En ausencia de unión del represor, la transcripción se inicia dentro de la región de solapamiento *trpP-trpO*, y continúa a lo largo de la **secuencia líder**, 162 nucleótidos antes del primer gen estructural (*trpE*). Dentro de esta secuencia líder se ha encontrado otro sitio de regulación, denominado *atenuador*, que se discute en la siguiente sección. Como veremos, esta unidad reguladora es parte esencial del mecanismo de control de este operón.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que el operón *trp* es un sistema de control reprimible, a diferencia del operón *lac*, que es un sistema de control inducible?

16.6 La atenuación es un proceso decisivo de la regulación del operón *trp* en *E. coli*

Charles Yanofsky, Kevin Bertrand y sus colaboradores observaron que, incluso en presencia de triptófano y cuando el operón *trp* está reprimido, la transcripción todavía puede iniciarse, generando la porción inicial del mRNA (la secuencia 5′ líder). Así, aunque el represor esté unido a la región operadora, la *expresión inicial* del operón no se inhibe completamente, lo que sugiere que debe haber mecanismos adicionales posteriores mediante los que el triptófano inhiba la transcripción y, por consiguiente, la síntesis de las enzimas. Yanofsky descubrió que, tras la iniciación de la transcripción, *en presencia de alta concentración de triptófano*, la síntesis del mRNA generalmente se termina en un punto situado a unos 140 nucleótidos del inicio del transcrito.

Este proceso se denomina **atenuación**[3], lo que indica el efecto de disminución de la expresión génica del operón.

Sin embargo, si no hay triptófano o si la concentración de éste es muy baja, la transcripción se inicia y no termina prematuramente, sino que continúa más allá de la secuencia líder a lo largo del DNA que codifica los genes estructurales, empezando con el gen *trpE*. En consecuencia, se forma el mRNA policistrónico y posteriormente se traducen las enzimas esenciales para la biosíntesis de triptófano. En la Figura 16.13(a) se muestra un esquema del operón *trp* y de los componentes genéticos implicados en el proceso de atenuación.

La identificación del sitio de atenuación fue posible gracias al aislamiento de mutaciones por deleción en la región comprendida entre los nucleótidos 115 y 140 de la secuencia líder. Estas mutaciones suprimen la atenuación. Este sitio se conoce como el **atenuador**. En la Figura 16.13 se resume la explicación propuesta por Yanofsky y sus colaboradores de cómo se produce la atenuación y de cómo se supera. La secuencia inicial de DNA que se transcribe genera una molécula de mRNA que tiene el potencial de plegarse en dos estructuras de pedúnculo y lazo mutuamente excluyentes, denominadas «horquillas». Si hay un exceso de triptófano, la horquilla que se forma se comporta como una estructura de **terminación**, y casi siempre la transcripción termina prematuramente. En cambio, si hay poco triptófano, se forma la estructura alternativa, conocida como **horquilla de antiterminación**. En este caso se permite que la transcripción prosiga más allá de la secuencia de DNA implicada, y se produce todo el mRNA. En las Figuras 16.13(b) y (c) se muestran estas horquillas.

La pregunta que queda por resolver es cómo la ausencia (o la baja concentración) de triptófano permite que se supere la atenuación. Un punto clave del modelo de Yanofsky es que, para que se forme la horquilla de antiterminación, debe traducirse el transcrito líder. Yanofsky descubrió que el transcrito líder incluye dos tripletes (UGG) que codifican triptófano, precedidos corriente arriba por una secuencia AUG de inicio que provoca la iniciación de la traducción por los ribosomas. Cuando hay una cantidad adecuada de triptófano, también hay $tRNA^{trp}$ cargados. En consecuencia, la traducción continúa después de estos tripletes y se forma la *horquilla de terminación*, como se muestra en la Figura 16.13(b). Si las células no disponen de triptófano, tampoco disponen de $tRNA^{trp}$ cargados. Entonces los ribosomas «se paran» durante la traducción de los tripletes, puesto que se reclaman $tRNA^{trp}$ cargados, pero no están disponibles por la falta de triptófano. Este suceso induce la formación de la horquilla de antiterminación en el transcrito, como se muestra en la Figura 16.13(c). En consecuencia, se supera la atenuación y la transcripción continúa, lo que conduce a la expresión del grupo completo de genes estructurales.

---

[3] El sustantivo «atenuación» procede del verbo atenuar, que significa reducir en fuerza, debilitar, suavizar.

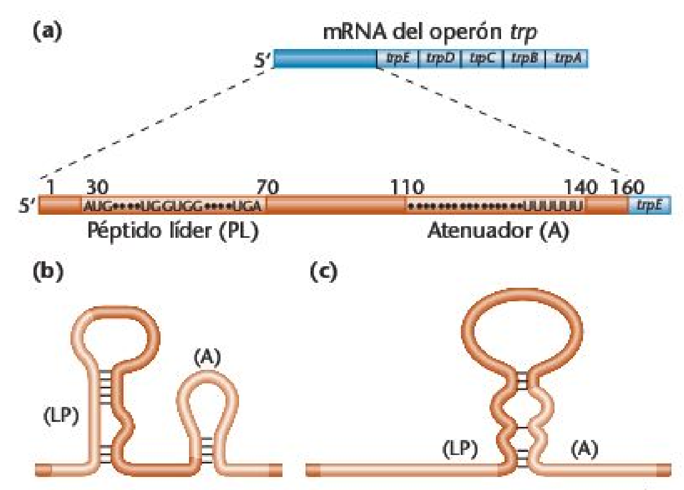


FIGURA 16.13 Esquema de la función de la secuencia líder del transcrito de mRNA del operón *trp* de *E. coli* durante la atenuación. (a) La secuencia 59 líder del operón trp se muestra expandida para identificar las porciones que codifican el péptido líder (PL) y la región atenuadora (A). También se identifican las secuencias nucleotídicas esenciales, que incluyen los tripletes UGG que codifican triptófano. (b) Horquilla de terminación, que se forma cuando el ribosoma prosigue la traducción tras superar los codones *trp*. (c) Horquilla de antiterminación, que se forma cuando el ribosoma se detiene en los codones *trp* porque el triptófano es escaso.

Actualmente se han resuelto y descrito los detalles de las estructuras secundarias del transcrito. Estas estructuras satisfacen las condiciones para la continuación de la transcripción y de la terminación (atenuación). Además, se han aislado otras mutaciones que afectan a la secuencia líder, y se han predicho las alteraciones que provocan en la estructura secundaria del transcrito y su impacto en la atenuación. En todas ellas se ha observado lo que se había predicho. El modelo de Yanofsky, aunque es complejo, ha ampliado de manera considerable el conocimiento de la regulación genética. Además, las pruebas que lo apoyan representan un enfoque que integra el análisis genético y el bioquímico, lo que es cada vez más común en la investigación en genética molecular.

La atenuación parece ser un mecanismo común a otros operones bacterianos en *E. coli* que regulan enzimas esenciales para la biosíntesis de aminoácidos. Además de triptófano, los operones implicados en el metabolismo de la treonina, la histidina, la leucina y la fenilalanina también muestran atenuadores en su secuencia líder. Como en el caso del operón *trp*, todos tienen múltiples codones que codifican el aminoácido que es regulado, que provoca la «detención» de la transcripción si falta el aminoácido adecuado. Por ejemplo, la secuencia líder del operón histidina codifica siete residuos histidina contiguos. La secuencia líder del operón treonina codifica ocho residuos treonina. Como en el caso del triptófano, cuando el aminoácido se encuentra presente no se produce ninguna detención de la transcripción, se forma la estructura de la horquilla de terminación y se produce la atenuación.

Dado que la atenuación implica una sincrónica de la transcripción y la traducción en el espacio y en el tiempo, este fenómeno es exclusivo de los procariotas. No es posible que se produzca un mecanismo como éste en los eucariotas, ya que en estos organismos la transcripción ocurre en el núcleo y la traducción en el citoplasma.

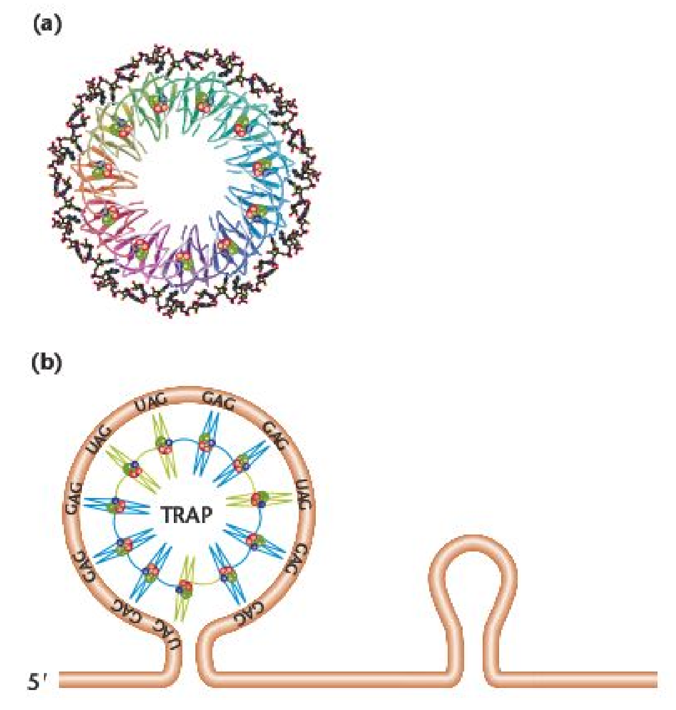
16.7 Las proteínas TRAP y AT dirigen la atenuación en *B. subtilis*

Es útil destacar que no todos los organismos, incluso los de un mismo tipo, solucionan los problemas como la regulación génica exactamente de la misma manera. De este modo, no es extraño descubrir estrategias nuevas surgidas durante la evolución. A menudo, la nueva aproximación es sólo una variación sobre el mismo tema. Este es el caso de la regulación del operón *trp* en bacterias.

Como ya se ha visto, *E. coli*, una bacteria Gram negativa, utiliza $tRNA^{trp}$ y una horquilla de terminación en la secuencia líder como base para atenuar la transcripción de su operón *trp*. La bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* también utiliza la atenuación y las horquillas para regular su operón *trp*. De hecho, *B. subtilis* sólo utiliza la atenuación para regularlo, y carece de un mecanismo que reprima completamente la transcripción de este operón, a diferencia de *E. coli*.

Sin embargo, las señales moleculares que causan la atenuación en *B. subtilis* no implican el proceso de traducción y la detención de la transcripción para inducir la formación de una horquilla que termine la transcripción, como sucede en *E. coli*. En cambio, tiene una proteína, aislada en 1990 por charles Yanofsky y sus colaboradores, que puede unirse o no a la secuencia líder atenuadora, que induce las configuraciones de terminación o antireminación alternativas, respectivamente.

La manera de *B. subtilis* de conseguir la atenuación es especial. Esta proteína, denominada **proteína atenuadora de unión al RNA del *trp*** (*TRAP*, del inglés *trp RNA-binding attenuation protein*), se une al triptófano si este se encuentra presente en la célula. TRAP está formada por 11 subunidades que forman una estructura proteica cuaternaria simétrica. Cada subunidad puede unirse a una molécula de triptófano, que incorpora en una profunda oquedad dentro de la proteína [Figura 16.14(a)]. Cuando está completamente saturada de triptófano, esta proteína puede unirse a la secuencia 5′ líder del transcrito de RNA, que contiene 11 tripletes repetidos GAG y UAG, separados entre sí por varios nucleótidos espaciadores. Cada triplete se une a una de las subunidades, que contiene un sitio de unión para el triplete. Esta unión [Figura 16.14(b)] forma un cinturón de RNA alrededor de TRAP, que evita que se forme la horquilla de antiterminación. El resultado es que se forma la configuración de terminación, que conduce a la terminación prematura de la transcripción y, en consecuencia, a la atenuación de la expresión del operón.



Horquilla de terminación
(cuando el triptófano abunda)

FIGURA 16.14 (a) Modelo de la proteína atenuadora de unión al RNA de *trp* (TRAP). Esta molécula simétrica está formada por 11 subunidades, cada una de las cuales puede unirse a una molécula de triptófano, que queda dentro de la subunidad. (b) Interacción de una molécula TRAP unida a triptófano con la secuencia líder del operón *trp* de B. subtilis. Esta interacción induce la formación de la horquilla de terminación, lo que atenúa la expresión del operón *trp*.

Esta estrategia de atenuación implica un mecanismo de regulación interesante. Hay dos observaciones que sugirieron a Yanofsky y a sus colaboradores que la estrategia de atenuación de *B. subtilis* podría ser todavía más compleja que lo que parecía. En primer lugar, la regulación del operón *trp* de *B. subtilis* es extremadamente sensible a un amplio rango de concentraciones de triptófano. Este ajunte tan fino sugiere que hay algo más que el simple mecanismo de conexión-desconexión atribuido a TRAP. Segundo, una mutación en el gen que codifica la triptofanil-tRNA sintetasa conduce a la sobre-expresión del operón *trp*, incluso en presencia de triptófano en exceso. Esta enzima es la responsable de cargar el $tRNA^{trp}$, y como se acumulan $tRNA^{trp}$ no cargados, se interrumpe la regulación. La interrupción de la regulación sugeriría que los $tRNA^{trp}$ no cargados desempeñan alguna función importante en la atenuación, lo que condujo a Yanofsky y a su colaboradora Angela Valbuzzi a preguntarse cómo el $tRNA^{trp}$ puede estar implicado con la TRAP. Lo que hallaron aumenta el conocimiento que se tiene de este sistema de regulación.

Estos investigadores descubrieron que existe otra proteína, denominada **anti-TRAP** (**AT**), que proporciona una señal metabólica de que el $tRNA^{trp}$ no está cargado, lo que indica que el triptófano es muy escaso en la célula. Yanofsky y Valbuzzi hipotetizaron que el $tRNA^{trp}$ no cargado induce a un operón separado a expresar el gen AT. Entonces la proteína AT se une a TRAP, específicamente cuando se encuentra en el estado activado por triptófano, inhibiendo que se una a su secuencia diana del RNA líder.

Un hallazgo como ese no añade sólo otra dimensión a nuestra comprensión de este sistema de regulación génica, sino que también explica la observación inicial de que la mutación en el gen de la $tRNA^{trp}$ sintetasa conduce a la sobre-expresión del operón *trp*. La mutación evita la carga del $tRNA^{trp}$, incluso en presencia de triptófano. Al acumularse el $tRNA^{trp}$ no cargado, induce la proteína AT, que se une a TRAP. Esto evita que TRAP se una a la secuencia líder del RNA, induciendo de manera anormalmente alta el operón *trp*.

La descripción precedente proporciona una idea de la complejidad de los mecanismos de regulación en bacterias. Una estrategia complicada como ésta, que es el resultado de un proceso evolutivo, atestigua la gran importancia de regular cuidadosamente la expresión génica en bacterias.

Ahora resuelva esto

El Problema 16.23 de la página 471 considera la regulación del operón *trp* de *B. subtilis*, que implica la proteína TRAP. Se le pide que prediga se expresan o no si los genes estructurales bajo determinadas condiciones.

Sugerencia: A diferencia de *E. coli*, que en la regulación del operón *trp* usa triptófano como represor y el proceso de atenuación, en *B. subtilis* la regulación se basa sólo en el proceso de atenuación y en la proteína TRAP.

16.8 El operón *ara* está controlado por una proteína reguladora que ejerce tanto el control positivo como el negativo

Terminaremos este capítulo discutiendo brevemente el **operón arabinosa** (***ara***) como se ha estudiado en *E. coli*. Este operón inducible es especial porque la misma proteína reguladora es capaz de ejercer tanto el control positivo como el negativo, y en consecuencia es capaz de inducir y de reprimir la expresión génica. Las diversas partes de la Figura 16.15 acompañan la siguiente descripción de las condiciones en que el operón es activo o inactivo:

1. El metabolismo del azúcar arabinosa está dirigido por los productos enzimáticos de tres genes estructurales, *araB*, *A*, y *D*. Su transcripción está controlada por la proteína reguladora AraC, codificada por el gen *araC*,

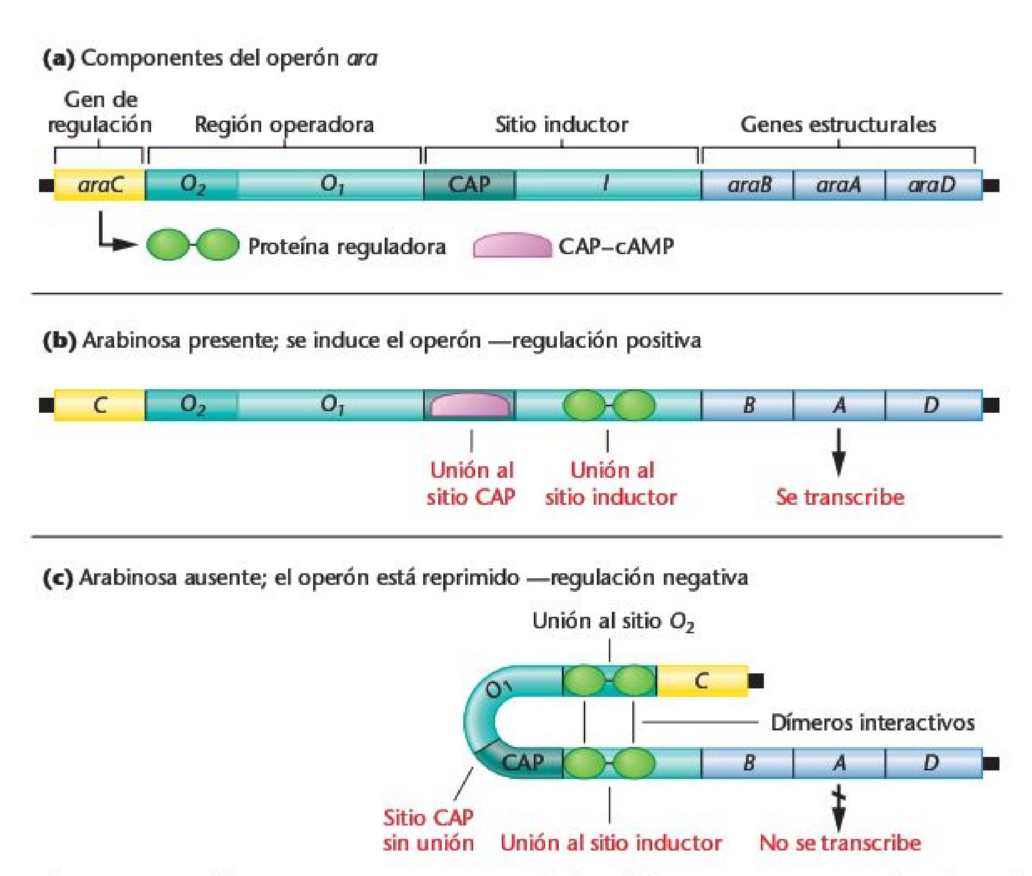


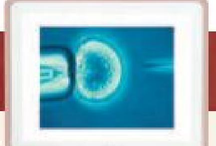
FIGURA 16.15 Regulación génica del operón *ara*. La proteína reguladora del gen *araC* actúa tanto de inductor (en presencia de arabinosa) como de represor (en ausencia de la misma).

que interacciona con dos regiones reguladoras, *araI* y *ara*O_2[4]. [Figura 16.15(a)]. Estos sitios se pueden unir de manera individual o coordinada a la proteína AraC.

2. La región *I* se denomina de esta manera porque cuando AraC se une sólo a ella, se induce el sistema [Figura 16.15(b)]. Para que esto ocurra, deben estar presentes tanto la arabinosa como el cAMP. De este modo, como en la inducción del operón *lac*, en la región promotora hay un sitio de unión a CAP, el cual modula la represión por catabolito en presencia de glucosa.
3. En ausencia tanto de arabinosa como de cAMP, la proteína AraC se une de manera coordinada al sitio *I* y al sitio O_2 (denominado de esta manera por ser la segunda región operadora descubierta en este operón). Cuando tanto I como O_2 están unidos a AraC, el DNA experimenta un cambio conformacional, formándose un lazo estrecho [Figura 16.15(c)], y los genes estructurales se reprimen.
4. La región O_2 se encuentra unos 200 nucleótidos corriente arriba de la región *I*. La unión a cualquiera de estas regiones reguladoras implica un dímero de AraC. Cuando se unen a ambas regiones, los dímeros interaccionan generando el lazo que causa la represión. Probablemente, este lazo inhibe el acceso de la RNA polimerasa a la región promotora. La región del DNA localizada entre *I* y O_2, que es la que forma el lazo, es vital para la formación del complejo de represión. La alteración genética de esta región mediante la inserción o la deleción de unos pocos nucleótidos es suficiente para interferir en la formación del lazo y, por lo tanto, con la represión.

Estos hallazgos sobre el operón *ara* sirven para ilustrar el grado de complejidad que existe en la regulación de un grupo de genes relacionados. Como se dijo al principio de este capítulo, el desarrollo de mecanismos de regulación ha proporcionado ventajas evolutivas a los sistemas bacterianos, permitiéndoles adaptarse a diversos ambientes naturales. Sin duda, estos sistemas están tan bien preparados genéticamente no solo para sobrevivir en condiciones fisiológicas cambiantes, sino también para hacerlo con una gran eficiencia bioquímica.

[4] También hay otra región operadora (O_1), pero no está implicada en la regulación de los genes estructurales ara.



Genética, tecnología y sociedad

Sentido de colectividad: cómo las bacterias hablan entre sí

Durante décadas, los científicos han observado las bacterias como microbios independientes, incapaces de establecer comunicaciones de célula a célula. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que muchas bacterias pueden regular la expresión génica y coordinar el comportamiento de grupo mediante un tipo de comunicación bacteriana denominada ***sentido de colectividad*** (*quorum sensing* en inglés). Mediante este proceso, las bacterias envían y reciben unas señales químicas denominadas autoinductores que transmiten información del tamaño de la población. Cuando el tamaño de la población alcanza el colectivo necesario, o «quorum», palabra que en términos económicos se define como el número mínimo de miembros de una organización que deben estar presentes para realizar negocios, los autoinductores regulan la expresión génica de acuerdo con ello. El fenómeno de sentido de colectividad se ha descrito en más de 70 especies de bacterias, y sus aplicaciones son muy amplias. Algunas bacterias marinas utilizan los autoinductores para controlar la bioluminiscencia, mientras determinadas bacterias patógenas utilizan señales parecidas para regular la expresión de factores tóxicos virulentos. El esclarecimiento de los complejos mecanismos del fenómeno de sentido de colectividad ha provocado la reevaluación de los conocimientos de la regulación génica en procariotas, y ya ha conducido a aplicaciones prometedoras para el desarrollo de alternativas a los antibióticos.

El campo del fenómeno del sentido de colectividad empezó en 1960, cuando los investigadores observaron que, durante el día, los calamares disminuyen la concentración de bacterias marinas bioluminiscentes de la especie *Vibrio fischeri* en el órgano luminiscente, y las bacterias dejan de brillar. *V. fischeri* tiene una relación simbiótica con el calamar *Euprymna scolopes*. Cuando el calamar busca comida durante la noche, utiliza la luz emitida por *V. fischeri* desde el órgano luminiscente para iluminar el suelo del océano, contrarrestando perfectamente las sombras generadas por la luz de la luna, que normalmente actúan de faro para los depredadores del calamar. Esta relación simbiótica proporciona a las bacterias un ambiente protegido y rico en nutrientes, dentro del órgano luminiscente del calamar.

¿Qué es lo que conecta los genes de luminiscencia (*lux*) en estas bacterias en respuesta a una alta densidad celular, y los desconecta en respuesta a una baja densidad celular? El «lenguaje» químico de las bacterias implicado en el fenómeno de sentido de colectividad está formado por dos clases principales de moléculas autoinductoras: lactronas homoserinas (HLS), utilizadas por las bacterias Gram negativas; y oligopéptidos, usados por las bacterias Gram positivas. En *V. fischeri*, el autoinductor responsable es un HLS. A un determinado tamaño crítico de la población, o «quorum», el HLS regula el operón lux uniéndose directamente a los factores de transcripción que regulan la expresión génica. Los oligopéptidos también regulan la expresión génica, pero lo hacen iniciando cascadas de fosforilación.

Puesto que la mayor parte de especies bacterianas usan autoinductores especiales que difieren en su estructura química y en sus propiedades, se pensaba que el fenómeno de sentido de colectividad sólo mediaba la comunicación entre los miembros de una misma especie. En 1994, Bonnie Bassler y sus colaboradores de la Universidad de Princeton salieron en grandes titulares cuando descubrieron que una molécula autoinductora de la bacteria marina *Vibrio harveyi* se encontraba también presente en otros muchos tipos de bacterias. Esta molécula, el autoinductor 2 (AI-2), tiene el potencial de mediar las «conversaciones de sentido de colectividad» y de servir de lenguaje universal para la comunicación bacteriana entre especies diferentes. Puesto que la acumulación de AI-2 es proporcional al número de células, y dado que su estructura puede variar ligeramente entre especies diferentes, la hipótesis actual es que AI-2 puede transmitir información sobre la densidad celular y también sobre las especies presentes en esa comunidad bacteriana. Este sistema de comunicación es muy ventajoso en la naturaleza, donde las poblaciones de bacterias contienen, por regla general, centenares de especies diferentes. Aunque en la actualidad sólo se conoce la estructura de AI-2 de *V. harveyi*, los investigadores están estudiando otras especies bacterianas para determinar si ligeras modificaciones de esta molécula representan diferentes palabras en el «lenguaje» bacteriano de AI-2.

Las bacterias patógenas también utilizan el fenómeno de sentido de colectividad para regular la expresión génica. En lugar de controlar la bioluminiscencia, estas bacterias se comunican para coordinar la producción de substancias tóxicas de virulencia o para evitar ser detectadas por el sistema inmunitario. Por ejemplo, *Vibrio cholerae*, el agente que provoca el cólera, utiliza AI-2 y un autoinductor adicional específico de esta especie para activar los genes que controlan la producción de la toxina colérica. *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram negativa que a menudo afecta a pacientes con fibrosis quística, usa el sentido de colectividad para regular la producción de elastasa, una proteasa que daña el epitelio respiratorio e interfiere con la función ciliar del mismo. *P. aeruginosa* también utiliza autoinductores para controlar la producción de biofilms, una dura capa protectora que resiste las defensas del huésped y hace que los tratamientos con antibióticos sean casi imposibles. Otras bacterias determinan la densidad celular mediante sentido de colectividad para retrasar la producción de sustancias tóxicas hasta que la colonia es suficientemente grande como para sobrepasar el sistema inmunitario del huésped y establecer así una infección.

Cada año, millones de pacientes hospitalizados adquieren infecciones bacterianas. Aunque algunas pueden ser tratadas convenientemente con antibióticos, las cepas de bacterias resistentes a antibióticos evolucionan más rápido de lo que los científicos desarrollan tratamientos alternativos. Sólo las infecciones de *Staphylococci* afec-

tan a 500.000 pacientes con instrumentos médicos implantados como catéteres y válvulas cardíacas artificiales, y el resultado es de aproximadamente 90.000 defunciones por año. Puesto que muchas bacterias dependen del sentido de colectividad para regular los genes que causan estas enfermedades, los tratamientos que bloqueen el proceso de sentido de colectividad pueden ayudar a combatir las infecciones. En 1999, Bonnie Bassler formó una compañía llamada Quorex con el objetivo de utilizar la investigación en el campo del sentido de colectividad para desarrollar nuevos agentes antibacterianos. En Junio de 2004, estos investigadores demostraron que si se usa instrumental médico implantado cubierto con un inhibidor de sentido de colectividad denominado RIP, se reduce en ratas el número de casos afectados por infecciones de *Staphylococcus*. Del mismo modo, también hay investigaciones en curso para desarrollar medicamentos que bloqueen el proceso de sentido de colectividad en *Bacillus anthracis*, la bacteria conocida generalmente como ántrax, y en *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria que puede ser mortal para los pacientes con fibrosis quística y aquellos que tengan el sistema inmunitario dañado. Se están ensayando también medicamentos parecidos que inhiben los mecanismos de comunicación bacteriana para evitar la formación de biofilms, reestablecer la potencia de los antibióticos y limitar el desarrollo de nuevas cepas de bacterias resistentes a antibióticos. De este modo, lo que empezó como una observación fascinante en el calamar luminiscente ha iniciado una emocionante era de investigación en genética bacteriana que algún día puede tener una gran importancia clínica.

Referencias

Camara, M., Hardman, A., Williams, P., and Milton, D. 2002. Quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Nature Genetics*. 32:217-218.

Federle, M.J., and Bassler, B.L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest*. 112:1291-1299.

Suga, H., and Smith, K.M. 2003. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Current Opinion in Chemical Biology*. 7:586-591.

RESUMEN DEL CAPÍTULO



1. Debe existir un sistema de regulación genética para que el genoma completo de todas las células de todas las especies no se esté transcribiendo continuamente durante toda su vida. Se han desarrollado mecanismos muy refinados que regulan la transcripción, lo que optimiza la eficiencia genética.
2. Se ha estado realizando con éxito el análisis genético de bacterias desde la década de 1940. La facilidad de obtener grandes cantidades de cultivos puros de cepas mutantes de bacterias como material de experimentación las ha convertido en los organismos de elección en numerosos tipos de estudios genéticos.
3. El descubrimiento y la investigación del operón *lac* en *E. coli* supuso el inicio del estudio de la regulación génica en bacterias. Los genes implicados en el metabolismo de la lactosa se regulan de manera coordinada mediante un sistema de control negativo, en el que la lactosa induce la expresión génica. En su ausencia, el sistema se desconecta.
4. La proteína activadora por catabolito (CAP) es esencial para la unión de la RNA polimerasa al promotor, y para la posterior transcripción del operón *lac* y de otros operones. Por lo tanto, CAP ejerce un control positivo sobre la expresión génica. Para que CAP estimule la expresión génica, debe estar unido a AMP cíclico.
5. Cuando hay glucosa, los niveles de AMP cíclico son bajos, no se produce la unión de CAP y los genes estructurales no se expresan. Este fenómeno se denomina represión por catabolito. Serte mecanismo es energéticamente eficiente, ya que *E. coli* prefiere la glucosa, incluso si también tiene lactosa.
6. Se ha aislado y estudiado el represor de *lac*. El análisis de su estructura cristalina ha demostrado cómo interacciona con el DNA del operón y con los inductores. Estos estudios han demostrado la existencia de cambios conformacionales en el DNA que conducen a la formación de un lazo de represión que inhibe la unión entre la RNA polimerasa y la región promotora del operón.
7. La biosíntesis de triptófano en *E. coli* implica unos enzimas cuya presencia o ausencia viene controlada por otro operón. A diferencia del operón inducible que controla el metabolismo de la lactosa, el operón *trp* es reprimible. En presencia de triptófano, se produce un represor activo que desconecta la expresión de los genes estructurales. Como en el operón *lac*, el operón *trp* funciona bajo control negativo.
8. En el operón *trp* se ha estudiado un paso de regulación adicional, conocido como atenuación. El mecanismo es diferente en *E. coli* y en *B. subtilis*, pero en ambos casos depende de estructuras en horquilla alternativas que se forman bajo diferentes condiciones en la secuencia líder del mRNA.
9. El operón *ara* es especial puesto que la misma proteína reguladora ejerce un control positivo y negativo sobre la expresión de los genes que codifican las enzimas que metabolizan el azúcar arabinosa.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Un operón hipotético (*hipo*) de *E. coli* contiene varios genes estructurales que codifican enzimas que están implicadas de manera secuencial en la biosíntesis de un aminoácido. A diferencia del operón *lac*, en el que el gen represor está separado del operón, el gen que codifica la molécula reguladora está dentro del operón *hipo*. Cuando el producto final (el aminoácido) está presente, se combina con la molécula reguladora, y este complejo se une al operador, reprimiendo el operón. En ausencia del aminoácido, la molécula reguladora no se une al operador, y se produce la transcripción.

Caracterice este operón, y después considere las siguientes mutaciones y la situación en la que células diploides parciales (F′) tienen el gen silvestre junto con el gen mutante:

(a) Mutación en el gen operador.

(b) Mutación en la región promotora.

(c) Mutación en el gen regulador.

En cada uno de estos casos, ¿se transcribirá o no se transcribirá el operón, suponiendo que la mutación afecte la regulación del operón *hipo*? Compare cada respuesta con la situación equivalente del operón *lac*.

Solución: El operón *hipo* es reprimible y está bajo control negativo. Cuando en el medio (o en el ambiente) no hay aminoácido, el producto del gen regulador no puede unirse a la región operadora, y el operón se transcribe dirigido por la RNA polimerasa. Se producen las enzimas necesarias para la síntesis del aminoácido, y también se produce la molécula reguladora. Si *hay* aminoácido en el medio, o éste se ha acumulado después de que se haya producido una síntesis suficiente, el aminoácido se une al regulador formando un complejo que interacciona con la región operadora, provocando la represión de la transcripción de los genes del operón.

El operón *hipo* es parecido al sistema del triptófano, con la excepción de que el gen regulador está dentro del operón en vez de estar separado. Por lo tanto, en el operón *hipo*, el gen regulador está regulado por la presencia o ausencia del aminoácido.

(a) Como en el operón *lac*, una mutación en el operón *hipo* inhibe la unión al complejo represor, y la transcripción se produce constitutivamente. La presencia de un plásmido F′ que contenga el alelo silvestre no tendrá ningún efecto puesto que no es adyacente a los genes estructurales.

(b) Una mutación en la región promotora de *hipo* inhibiría, sin lugar a dudas, la unión de la RNA polimerasa y por lo tanto la transcripción. Esto también sucedería en el operón *lac*. Un alelo silvestre localizado en el plásmido F′ no tendría ningún efecto.

(c) Una mutación en el gen regulador de *hipo*, como en el sistema *lac*, podría inhibir la unión de su producto al represor o al gen operador. En ambos casos la transcripción será constitutiva, puesto que el sistema *hipo* es reprimible. Ambos casos resultan en la falta de unión del regulador al operador, lo que permite que se produzca la transcripción. En el sistema *lac*, la falta de unión del correpresor lactosa reprimirá permanentemente el sistema. La adición de un alelo silvestre restablecería la capacidad de represión, siempre que este gen se transcriba constitutivamente.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Compare la necesidad de enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa y del triptófano en bacterias en (a) presencia y en (b) ausencia de lactosa y de triptófano, respectivamente.
2. Compare los sistemas de control positivo y negativo.
3. Compare la función del represor en un sistema inducible y en un sistema reprimible.
4. Aunque los genes estructurales *lacZ*, *Y* y *A* se transcriben como un mRNA policistrónico, cada gen contiene las señales de iniciación y terminación necesarias para la traducción. Prediga qué ocurrirá cuando una célula que esté creciendo en presencia de lactosa contenga una deleción de un nucleótido (a) al principio del gen *Z* y (b) al principio del gen *A*.
5. Para los genotipos del operón *lac* que se muestran en la siguiente tabla, prediga si el gen estructural (Z) es constitutivo, si está permanentemente reprimido, o si se induce en presencia de lactosa.

Genotipo	Constitutivo	Reprimido	Inducible
$I^+O^+Z^+$			x
$I^-O^+Z^+$			
$I^+O^cZ^+$			
$I^-O^+Z^+/F'I^+$			
$I^+O^cZ^+/F'O^+$			
$I^sO^+Z^+$			
$I^sO^+Z^+/F'I^+$			

6. Para los genotipos y condiciones que se muestran en la siguiente tabla (presencia o ausencia de lactosa), prediga si se producirán enzimas funcionales, si se producirán enzimas no funcionales, o si no se producirán enzimas.

Genotipo	Condición	Se produce enzima funcional	Se produce enzima no funcional	No se produce enzima
$I^+O^+Z^+$	Sin lactosa			X
$I^+O^cZ^+$	Con lactosa			
$I^-O^+Z^-$	Sin lactosa			
$I^-O^+Z^-$	Con lactosa			
$I^-O^+Z^+/F'I^+$	Sin lactosa			
$I^+O^cZ^+/F'O^+$	Con lactosa			
$I^+O^+Z^-/F'I^+O^+Z^+$	Con lactosa			
$I^-O^+Z^-/F'I^+O^+Z^+$	Sin lactosa			
$I^sO^+Z^+/F'O^+$	Sin lactosa			
$I^+O^cZ^+/F'O^+Z^+$	Con lactosa			

7. Se ha determinado la localización de numerosas mutaciones *lacI*$^-$ y *lacI*^{s} dentro de la secuencia de DNA del gen *lacI*$^+$. De ellas, se encontró que las mutaciones *lacI*$^-$ se localizan en la región 59 corriente arriba del gen, mientras que las mutaciones *lacI*^{s} se localizan corriente abajo del gen, alejadas de él. ¿Esta localización es congruente con lo que se sabe de la función del represor, que es el producto del gen *lacI*$^+$?

8. Describa la lógica experimental que permitió aislar el represor de *lac*.

9. ¿Qué características demuestran que el represor de *lac* es una proteína? Describa las pruebas de que sirve con certeza como represor dentro del esquema del operón.

10. Prediga el nivel de actividad genética del operón *lac* y el estado del represor de *lac* y de la proteína CAP en las condiciones celulares que se enumeran en la siguiente tabla.

	Lactosa	Glucosa
(a)	–	–
(b)	+	–
(c)	–	+
(d)	+	+

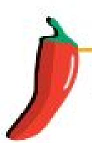
11. Prediga el efecto sobre la capacidad de inducción del operón *lac* de una mutación que interrumpa la función de (a) el gen *crp*, que codifica la proteína CAP, y (b) el sitio de unión a CAP del promotor.

12. Describa la función de la atenuación en la regulación de la biosíntesis del triptófano.

13. Cuando se descubrió la atenuación del operón *trp* en la década de 1970, se interpretó como una manera relativamente poco eficiente de alcanzar la regulación genética de este operón. Sin embargo, desde entonces se ha hallado que la atenuación es una estrategia de regulación relativamente común. Suponiendo que la atenuación sea una manera relativamente poco eficiente de regular la expresión, ¿qué explicaría su amplia utilización?

14. La neelaredoxina es una proteína de 15 kDa común en procariotas anaeróbicos. Tiene una actividad de búsqueda de superóxidos y se *expresa constitutivamente*. Además, si se expone a O_2 o a H_2H_2 su expresión deja de *inducirse*. (Silva, G., *et al.* 2001. *J. Bacteriol.* 183:4413-20) ¿Qué significan los términos *expresión constitutiva* e *inducción* en el contexto de la síntesis de neelaredoxina?

15. Los productos lácteos como el queso y los yogures dependen de la conversión de la lactosa en glucosa y en galactosa realizada por diversas bacterias anaeróbicas, como diversos *Lactobacillus*, que finalmente producen ácido láctico. Estas conversiones dependen de la permeasa y de la β-galactosidasa del operón *lac*. Después de ser seleccionada para realizar una fermentación rápida para la producción de yogur, una subespecie de *Lactobacillus* perdió la capacidad de regular la expresión del operón *lac*. (Lapierre, L., et al. 2002. *J. Bacteriorl.* 184:928-35) ¿Qué considera más probable, que es esta subespecie el operón *lac* esté activado o no activado? ¿Qué sucesos genéticos podrían haber contribuido a esta pérdida de regulación?



Problemas extra-picantes

16. Las estrategias bacterianas para evadir diversos antibióticos naturales o generados por los humanos son diversas, e incluyen bombas de flujo unidas a membrana que eliminan los antibióticos de la célula. En una revisión sobre estas bombas (Grkovic, S., et el., 2002. *Microb. and Mol. Biol. Rev.* 66:671-701) se dice que, puesto que se necesita energía para que estas bombas funcionen, hay una desventaja selectiva en la activación de estas bombas en ausencia del antibiótico. También se dice que un antibiótico dado puede tener una función en la regulación interaccionando tanto con la proteína activadora como con la represora, en función del sistema particular implicado. ¿Cómo se podrían agrupar estos sistemas en términos de *control negativo* (*inducible o reprimible*) y de *control positivo* (*inducible o reprimible*)?

17. En un operón hipotético, los genes *A*, *B*, *C* y *D* representan el gen represor, la secuencia promotora, el gen operador, y el gen estructural, *pero no necesariamente en este orden*. Este operón está implicado en el metabolismo de una molécula hipotética (mh). Con los datos que se muestran a continuación, decida primero si el operón es inducible o reprimible. Después asigne los genes *A*, *B*, *C* y *D* a las cuatro partes del operón. Explique su razonamiento. (EA = enzima activa; EI = enzima inactiva; SE = sin enzima)

Genotipo	tm presente	tm ausente
$A^+B^+C^+D^+$	EA	SE
$A^-B^+C^+D^+$	EA	EA
$A^+B^-C^+D^+$	SE	SE
$A^+B^+C^-D^+$	EI	SE
$A^+B^+C^+D^-$	EA	EA
$A^-B^+C^+D^+/F'A^+B^+C^+D^+$	EA	EA
$A^+B^-C^+D^+/F'A^+B^+C^+D^+$	EA	SE
$A^+B^+C^-D^+/F'A^+B^+C^+D^+$	EA + EI	SE
$A^+B^+C^-D^+/F'A^+B^+C^+D^+$	EA	SE

18. Un operón bacteriano es responsable de la producción de las enzimas biosintéticas necesarias para la producción del aminoácido hipotético tisófano (tis). Este operón está regulado por un gen separado, el gen *R*, cuya deleción provoca la pérdida de la síntesis de las enzimas. En condiciones silvestres, cuando tis está presente, no se producen las enzimas. En ausencia de tis, se producen las enzimas. Mutaciones en el gen operador (O^-) resultan en represión sin tener en cuenta la presencia de tis.

¿Está este operón bajo control positivo o bajo control negativo? Proponga un modelo (a) para la represión de los genes en las células silvestres en presencia de tis, y (b) para las mutaciones O^2.

19. Se aísla una bacteria marina que contiene un operón inducible cuyos productos genéticos metabolizan el aceite cuando éste se encuentra en el medio. El examen demuestra que el operón está bajo control positivo, y que hay un gen *reg* cuyo producto interacciona con una región operadora (*o*) que regula los genes estructurales, denominados *sg*.

Para entender como funciona el operón, se aislaron y analizaron una cepa mutante constitutiva y varias cepas diploides parciales. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Cromosoma huésped	Factor F′	Fenotipo
silvestre	Sin F′	inducible
silvestre	gen *reg* de una cepa mutante	inducible
silvestre	operón de una cepa mutante	constitutive
cepa mutante	gen *reg* de una cepa silvestre	constitutive

Extraiga todas las conclusiones posibles de la mutación así como de las características de la regulación de este operón. ¿Está la mutación constitutiva en el elemento *reg* que actúa en *trans* o en el elemento *o* operador que actúa en *cis*?

20. El producto del gen *lexA*, el represor LexA, regula negativamente los genes de reparación SOS de *E. coli* (discutido en el Capítulo 13). Cuando una célula sufre un gran daño en su DNA, el producto del gen *recA* (RecA) inactiva el represor LexA, y la transcripción de los genes SOS incrementa drásticamente.

Uno de los genes SOS es el gen *uvrA*. Imagine que está investigando la función del producto génico de *uvrA* en la reparación del DNA. Aísla una cepa mutante que tiene expresión constitutiva de la proteína UvrA, y la nombra *uvrA*^{C}. A continuación se muestra un esquema simple de los operones *lexA* y *uvrA*:



(a) Describa dos mutaciones diferentes que resulten en un fenotipo de expresión constitutiva de *uvrA*. Indique los genotipos reales implicados.
(b) Resuma una serie de experimentos genéticos utilizando cepas diploides parciales que permita determinar cuál de las dos posibles mutaciones ha aislado.

21. Un estudiante suyo considera el asunto tratado en el Problema 20 y argumenta que se puede realizar un experimento no genético más directo para diferenciar entre estos dos tipos de mutaciones. Si bien este experimento no precisa de genética sofisticada, debe poder analizar fácilmente los productos de los otros genes SOS. Proponga este experimento.

22. En la Figura 16.13 se representan varias regiones de emparejamiento de bases del mRNA que desempeñan funciones importantes durante el proceso de atenuación del operón *trp*. A continuación (a todo lo ancho de la página) se muestra la secuencia de ribonucleótidos que constituyen la secuencia líder, y que empieza en la posición 30 corriente abajo desde el extremo 59:

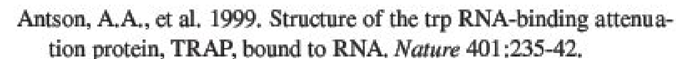
AUGAAAGCAAUUUUCGUACUGAAAGGUUGGUGGCGCACUUCCUGAAACGGGCAGUGUAUUCACCAUGCGUAAAGCAAUCAGAUACCCAGCCCGCCUAAUGAGCGGGCUUUUUUUU

Dentro de esta molécula están las secuencias que sirven de base para la formación de las estructuras secundarias esenciales para la formación de las horquillas alternativas, y también para los tripletes sucesivos que codifican triptófano, en los que se produce la detención durante la traducción. En un trozo grande de papel (como papel de envolver de tipo manila) y junto con compañeros suyos, analice esta secuencia de bases e intente identificar los codones *trp* y qué partes de la molécula representan las regiones de emparejamiento de bases que forman la horquilla de terminación y de antiterminación que se muestran en la Figura 16.13.

23. Considere la regulación del operón *trp* en *B. subtilis*. Para cada uno de los siguientes casos, indique si se están expresando o no los genes estructurales del operón:

(a) TRAP presente, $tRNA^{trp}$ abundante, triptófano abundante.
(b) TRAP presente, $tRNA^{trp}$ abundante, triptófano escaso.
(c) TRAP presente, $tRNA^{trp}$ escaso, triptófano abundante.
(d) TRAP ausente, $tRNA^{trp}$ abundante, triptófano abundante.

Indique también en cada caso si AT se encuentra presente. Describa la función de TRAP y de AT en la atenuación.



LECTURAS SELECCIONADAS

Antson, A.A., et al. 1999. Structure of the trp RNA-binding attenuation protein, TRAP, bound to RNA. *Nature* 401:235-42.

Beckwith, J.R., and Zipser, D., eds. 1970. *The Lactose Operon.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bertrand, K., et al. 1975. New features of the regulation of the tryptophan operon. *Science* 189:22-26.

Gilbert, W., and Müller-Hill, B. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:1891-98.

______. 1967. The *lac* operator is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:2415-21.

Jacob, F., and Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318-56.

Lee, D., and Schleif, R. 1989. *In vivo* DNA loops in *araCBAD:* Size limits and helical repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:476-80.

Lewis, M., et al. 1996. Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271:1247-54.

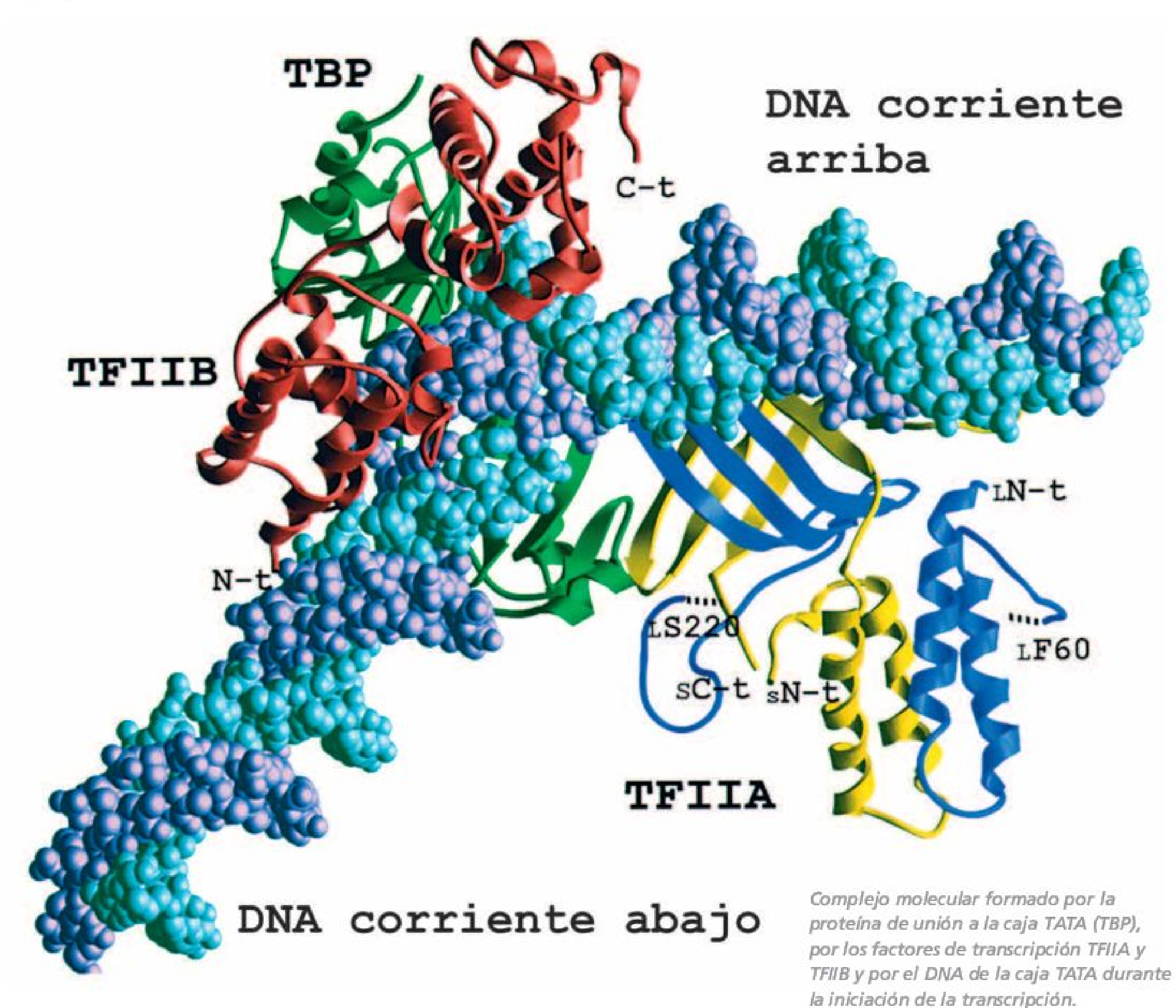
Stroynowski, I., and Yanofsky, C. 1982. Transcript secondary structures regulate transcription termination at the attenuator of *S. marcescens* tryptophan operon. *Nature* 298:34-38.

Valbuzzi, A., and Yanofsky, C. 2001. Inhibition of the *B. subtilis* regulatory protein TRAP by the TRAP-inhibitory protein, AT. *Science* 293:2057-61.

Yanofsky, C. 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289:751-58.

Yanofsky, C., and Kolter, R. 1982. Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Annu. Rev. Genet.* 16:113-34.

Regulación de la expresión génica en eucariotas



Complejo molecular formado por la proteína de unión a la caja TATA (TBP), por los factores de transcripción TFIIA y TFIIB y por el DNA de la caja TATA durante la iniciación de la transcripción.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La regulación génica en eucariotas es muy diferente de la regulación génica en procariotas.
- La organización de la cromatina en el núcleo desempeña una función importante en la regulación de la expresión génica en eucariotas.
- El ensamblaje de los componentes de la transcripción se produce en el sitio promotor. Las proteínas que se unen a los sitios intensificadores afectan a la tasa de iniciación de la transcripción.
- Factores como la metilación del DNA pueden ser importantes para la regulación de la expresión génica.
- La regulación postranscripcional incluye el corte y empalme alternativo del pre-mRNA.
- El control de la estabilidad del mRNA es una de las maneras de regular la expresión génica después de la transcripción.

Seminario Web 17.1
Regulación de la expresión génica: eucariotas

En los eucariotas pluricelulares, la expresión génica diferencial es el núcleo central del desarrollo embrionario y del mantenimiento del estado adulto. Las células del páncreas, por ejemplo, no producen pigmentos de la retina, ni las células de la retina producen insulina. La pregunta es, pues, ¿cómo un organismo expresa un conjunto de genes en un tipo celular, y un conjunto diferente de genes en otro tipo celular? A nivel celular, esta regulación *no* se realiza eliminando la información genética que no se utiliza; por el contrario, hay mecanismos que activan porciones específicas del genoma y que reprimen la expresión de otros genes. La regulación de la expresión génica se realiza mediante mecanismos de control positivos (activación de la expresión) y negativos (represión de la expresión). La activación y la represión de loci seleccionados representa un delicado equilibrio para un organismo; la expresión de un gen en un momento equivocado, en un tipo celular erróneo o en cantidades anormales puede conducir a un fenotipo deletéreo, como cáncer o muerte celular, aunque el gen sea normal.

En este capítulo se expondrán algunas de las características generales de la regulación en eucariotas, se resumirán los componentes necesarios para la iniciación de la transcripción y se discutirán las interacciones de estos componentes. Cuando convenga, también se compararán las aproximaciones más complejas que muestran los eucariotas con las correspondientes aproximaciones de los procariotas, menos complejas.

17.1 La regulación génica en los eucariotas difiere de la regulación en los procariotas

Hay diversos motivos por los que la regulación génica es más compleja en eucariotas que en procariotas.

1. Las células eucarióticas contienen mucha más información genética que las células procarióticas, y su DNA está acomplejado a histonas y a otras proteínas para formar la cromatina. Como veremos, la estructura de la cromatina, tanto si está abierta (descondensada) y está disponible para ser transcrita como si está cerrada (condensada) y no está disponible para este proceso, es el principal interruptor de la regulación génica. (Recuerde que en los procariotas son determinadas secuencias de DNA, como los operadores y los activadores, las que sirven de interruptor.)
2. Los eucariotas contienen la información genética repartida en muchos cromosomas (en lugar de en uno solo), y estos cromosomas están rodeados por la doble membrana nuclear.
3. Puesto que en los eucariotas la información genética está segregada del citoplasma, la transcripción está separada de la traducción tanto espacial como temporalmente; la transcripción ocurre en el núcleo, y la traducción se produce posteriormente en el citoplasma.
4. Los transcritos de los genes eucarióticos se procesan antes de ser transportados al citoplasma.
5. El mRNA eucariótico tiene una vida media ($t_{1/2}$) mucho más larga que el procariótico. La mayoría de los procariotas son organismos unicelulares, por lo que deben ser capaces de responder con rapidez a los cambios ambientales, y la rápida degradación del mRNA es un mecanismo adaptativo que permite una respuesta rápida.
6. Puesto que este mRNA es mucho más estable, los eucariotas utilizan mucho los controles de la traducción.
7. La mayoría de los eucariotas son organismos pluricelulares con tipos celulares diferenciados. Típicamente, los distintos tipos celulares utilizan diferentes conjuntos de genes para hacer proteínas diferentes, a pesar de que cada célula contiene todos los genes.

Por ello, resulta evidente que la regulación de la expresión génica en los eucariotas puede producirse a muchos niveles (Figura 17.1), que incluyen (1) el control transcripcional, (2) el control postranscripcional (p.e., el procesamiento del pre-

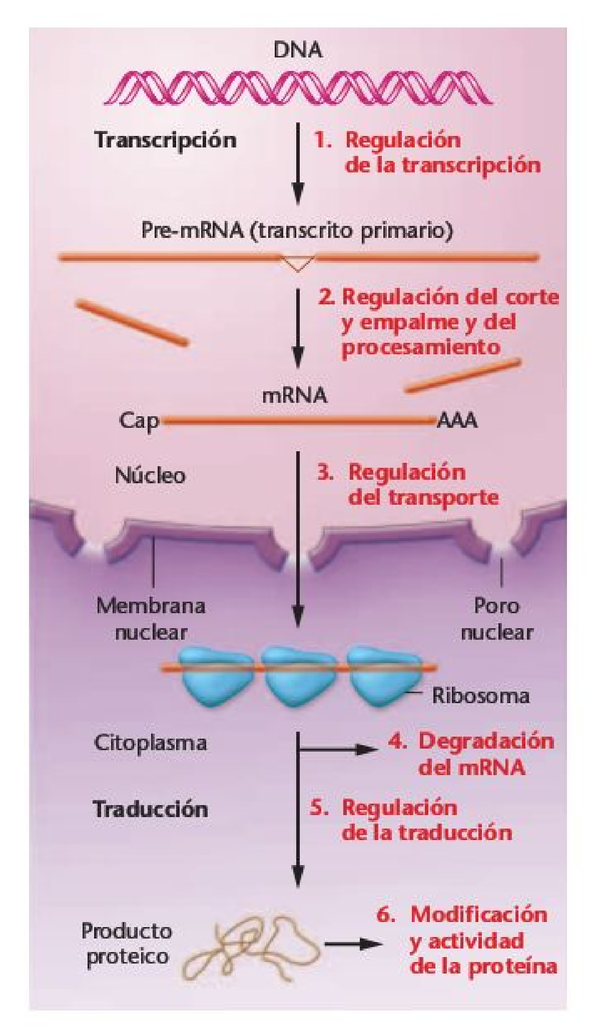


FIGURA 17.1 Diversos niveles posibles de regulación durante la expresión del material genético.

mRNA), (3) el transporte al citoplasma, (4) la estabilidad del mRNA; (5) el control de la traducción (p.e., seleccionando el mRNA que se transcribe) y (6) las modificaciones postraduccionales del producto proteico. Puesto que la mayoría de genes eucarióticos están regulados, en parte, a nivel transcripcional, en este capítulo se pondrá énfasis en este tipo de control, aunque también se discutirán los otros niveles de control.

17.2 La organización de los cromosomas en el núcleo influye en la expresión génica

Durante la interfase del ciclo celular, los cromosomas están desempaquetados y no pueden verse como estructuras intactas al microscopio óptico. El desarrollo de las técnicas de pintado cromosómico ha revelado que el núcleo interfásico no es una bolsa llena de brazos liados de cromosomas, sino que es una estructura altamente organizada. Además, cada vez está más claro que la organización nuclear de los cromosomas y los cambios dinámicos de la estructura de la cromatina son elementos clave para controlar la expresión génica en las células eucariotas. Antes de examinar los sucesos a nivel molecular de la iniciación de la expresión génica, primero examinaremos los mecanismos estructurales que determinan si un gen se transcribirá o no.

En el núcleo interfásico, cada cromosoma ocupa un dominio discreto denominado **territorio cromosómico**, que lo separa de los otros cromosomas (Figura 17.2). Los cromosomas se organizan en el núcleo según su tamaño y su densidad génica, de manera que los cromosomas con menos genes se localizan en la periferia y los cromosomas con una mayor densidad génica en la parte más interna. Los canales que hay entre los cromosomas se denominan **compartimentos intercromosómicos**. Cada compartimiento es un espacio entre cromosomas que contiene muy poco DNA o no contiene DNA.

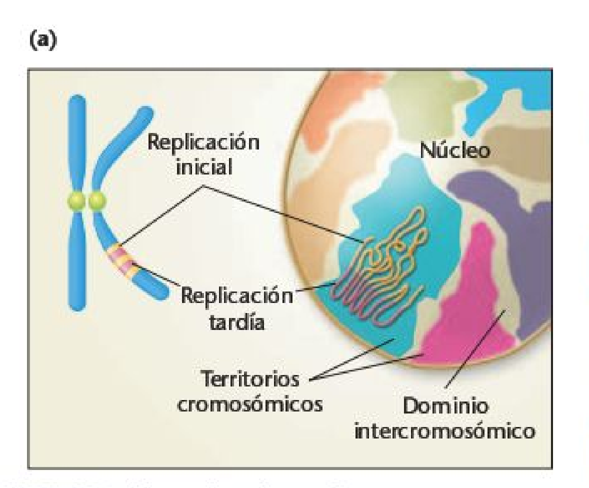
La estructura de los cromosomas se reajusta continuamente, de manera que los genes transcripcionalmente activos se desplazan hasta el borde de los territorios cromosómicos, en la frontera de los canales de los dominios intercromosómicos (Figura 17.2). Aunque las pruebas sugieren que la transcripción de muchos genes, sino de la mayoría, ocurre cuando están en contacto directo con la frontera entre el cromosoma y el compartimiento intercromosómico, otras pruebas sugieren que la transcripción también puede producirse entre territorios cromosómicos.

Cuando el gen se ha desplazado al extremo del territorio cromosómico, la iniciación de la expresión génica requiere dos pasos: (1) la remodelación y la activación de la cromatina por enzimas que alteran la estructura de los nucleosomas, lo que hace que los sitios promotores queden accesibles a la maquinaria transcripcional; y (2) el reclutamiento de coactivadores que ensamblan las proteínas necesarias para la transcripción, que incluyen factores de transcripción generales y la RNA polimerasa II. En posteriores secciones de este capítulo se describirá detalladamente cada uno de estos mecanismos. En la próxima sección describiremos los componentes que se precisan en la transcripción, y los sucesos que conducen a la producción de moléculas de mRNA a partir de un gen transcrito.

17.3 La iniciación de la transcripción es la principal forma de regulación génica

En los Capítulos 12 y 15 se expuso la estructura de los genes eucarióticos. Recuerde que estos genes tienen tres tipos de secuencias reguladoras en *cis* que controlan la transcripción: los promotores, los silenciadores y los intensificadores. En la Figura 17.3 se muestran estos elementos junto con otros que

(a)



(b)

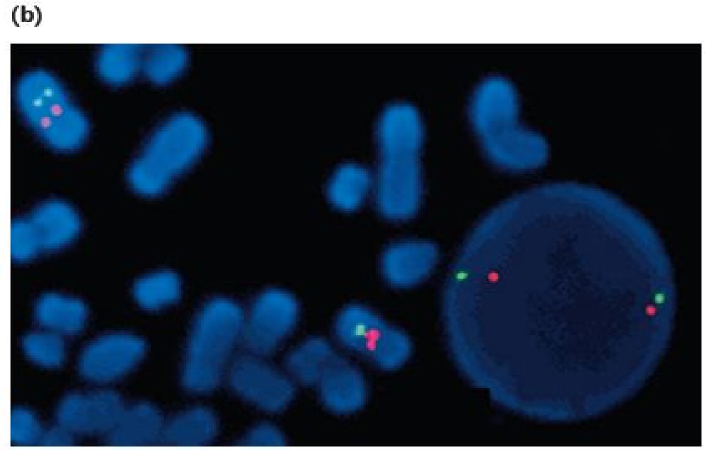


FIGURA 17.2 (a) En el núcleo, cada cromosoma ocupa un territorio discreto, y está separado de los otros cromosomas por un dominio intercromosómico, en el que se cree que se produce la transcripción y el procesamiento. (b) Sondas fluorescentes (FISH) hibridadas al cromosoma 7 humano. A la izquierda se muestra la hibridación en cromosomas metafásicos. En el núcleo (derecha) las sondas revelan la localización de los territorios ocupados por el cromosoma 7.

FIGURA 17.3 La expresión de los genes eucarióticos es controlada por elementos reguladores directamente adyacentes al gen, como los promotores, y por secuencias que pueden estar alejadas de la unidad transcripcional, como los intensificadores y los silenciadores.

también controlan la expresión de un gen eucariótico. La transcripción de un DNA en una molécula de mRNA es un proceso complejo altamente regulado que implica diferentes tipos de secuencias de DNA, la interacción de más de 100 proteínas, la remodelación de la cromatina y el plegamiento y la formación de lazos de las secuencias de DNA. Empezaremos tratando algunas de las secuencias de DNA que regulan la transcripción.

Los promotores tienen una organización modular

Los **promotores** son secuencias nucleotídicas que sirven de punto de reconocimiento para la maquinaria transcripcional. Representan la región necesaria para *iniciar* la transcripción a nivel basal. Se localizan inmediatamente adyacentes a los genes que regulan. Generalmente, las regiones promotoras tienen varios cientos de nucleótidos de longitud y especifican el sitio en el que empieza la transcripción y su dirección a lo largo del DNA.

La región promotora de la mayoría de genes contiene varios elementos, que incluyen las cajas TATA, CAAT y GC. La región a la que se une la RNA polimerasa II es una secuencia denominada **caja TATA**, conocida también como **núcleo del promotor**. Se localiza a unas 25-30 bases corriente arriba del punto inicial de transcripción (se designa como −25 a −30), y está formada por una secuencia consenso de 7-8 pares de bases (conservada en la mayoría de los genes analizados) compuesta sólo por pares AT, a menudo flanqueadas a ambos lados por regiones ricas en GC. El análisis genético de las secuencias TATA muestra que las mutaciones en la caja TATA reducen la transcripción, y que las deleciones pueden alterar el punto de inicio de la transcripción (Figura 17.4).

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué prueba confirma que las regiones promotoras controlan la iniciación de la transcripción?

Muchas regiones promotoras también contienen **cajas CAAT**. La secuencia consenso de estos elementos es CAAT o CCAAT. La caja CAAT se localiza frecuentemente en la región de 70 a 80 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. El análisis mutacional sugiere que las cajas CAAT son los sitios donde las proteínas se unen al DNA, y que son esenciales para la capacidad del promotor de facilitar la transcripción. Mutaciones a ambos lados de este elemento no tienen ningún efecto en la transcripción, mientras que mutaciones dentro de la secuencia CAAT disminuyen drásticamente la tasa de transcripción (Figura 17.4). Otro elemento que se encuentra a menudo en algunas regiones promotoras es la denominada **caja GC**, cuya secuencia consenso es GGGCGG y a menudo se encuentra, aproximadamente, en la posición −110. Los ele-

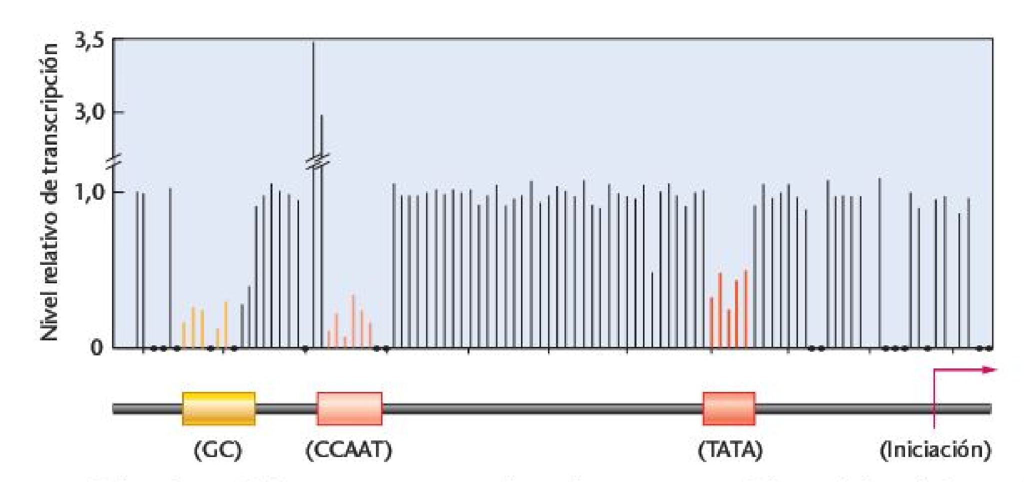


FIGURA 17.4 Resumen de los efectos de las mutaciones puntuales en la transcripción del gen de la β-globina. Cada línea representa el nivel de transcripción (respecto al silvestre) producido por la mutación de un solo nucleótido en la región promotora en experimentos separados. Los puntos representan nucleótidos de los que no se obtuvieron mutaciones. Obsérvese que las mutaciones dentro de los elementos del promotor son las que tienen el mayor efecto sobre el nivel de la transcripción.

mentos CAAT y CG se unen a los factores de transcripción y funcionan de manera parecida a los intensificadores, que trataremos en la siguiente sección.

Resumiendo, las secuencias promotoras de los genes eucarióticos son módulos cuya localización y organización varía (Figura 17.5). En las regiones promotoras no hay componentes universales; los genes difieren en el tipo, en el número, en la distancia entre los elementos promotores y en su orientación.

Los intensificadores controlan la tasa de transcripción

Además de las regiones promotoras, la transcripción de los genes eucarióticos también está regulada por secuencias de DNA denominadas **intensificadores**. Los intensificadores pueden estar a cualquier lado del gen, a cierta distancia del mismo e incluso dentro de él. Son reguladores en *cis* porque se encuentran adyacentes a los genes que regulan, en oposición a los reguladores en *trans* (p.e. las proteínas de unión), que pueden regular un gen en cualquier cromosoma.

Típicamente, los intensificadores interaccionan con múltiples proteínas reguladoras y con factores de transcripción, y pueden incrementar la eficiencia de la iniciación de la transcripción y activar el promotor. En los sitios intensificadores, a menudo se encuentran sitios de unión para reguladores génicos positivos y negativos. De esta manera, hay un cierto grado de analogía entre los intensificadores y las regiones operadora y activadora de los procariotas. Sin embargo, los intensificadores parecen ser mucho más complicados tanto estructural como funcionalmente. Los intensificadores estimulan enormemente la actividad transcripcional del promotor, y poseen diversas características que los distinguen de los promotores:

1. La posición del intensificador no es fija; puede estar localizado corriente arriba, corriente abajo o dentro del gen que regula.
2. Puede invertirse su orientación sin que se produzcan efectos significativos en su acción.
3. Si experimentalmente se mueve un intensificador a otra posición en el genoma, o si un gen no relacionado se coloca cerca del intensificador, se intensifica la transcripción del gen adyacente.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que la acción de los intensificadores no es necesariamente específica de cada gen?

Un ejemplo de intensificador localizado *dentro* del gen que regula es el de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, cuyo gen tiene un intensificador que se localiza dentro de un intrón, entre dos regiones codificantes. Este gen es activo sólo en las células que expresan los genes de las inmunoglobulinas, lo que indica que la expresión génica específica de tejido puede modularse mediante los intensificadores. Se han descubierto intensificadores internos en otros genes eucarióticos, como en el de la cadena ligera de las inmunoglobulinas.

El gen de la beta-globina humana y el de la timidina quinasa de pollo tienen intensificadores localizados corriente abajo. En el pollo hay un intensificador situado entre los genes de la β-globina y de la ϵ-globina que actúa en una dirección para controlar la transcripción del gen de la ϵ-globina durante el desarrollo embrionario y en la dirección opuesta para regular la expresión del gen de la β-globina durante la vida adulta. La le-

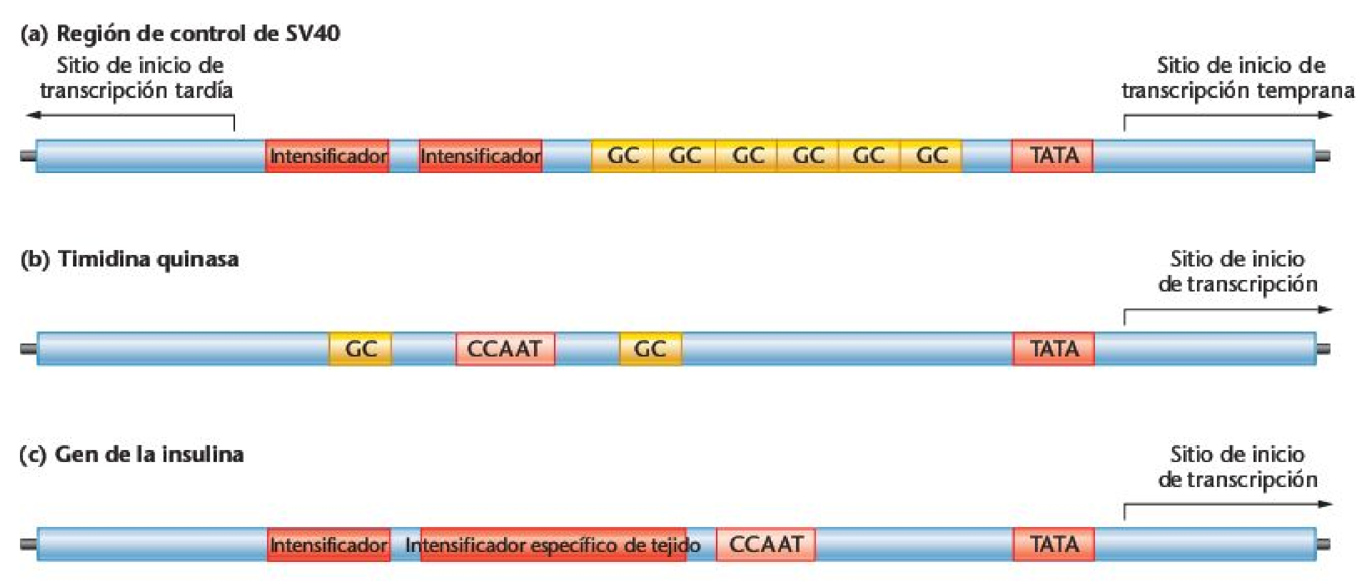


FIGURA 17.5 Organización de las regiones promotoras en varios genes eucarióticos, que muestran la variabilidad de las características, del número y de la ordenación de los elementos controladores.

vadura tiene secuencias reguladoras parecidas a los intensificadores, denominadas **secuencias activadoras corriente arriba** (**UAS**, del inglés *upstream activator sequences*), que pueden funcionar corriente arriba a distancias variables y en cualquier orientación. Se diferencian de los intensificadores en que no pueden actuar corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción.

Como los promotores, los intensificadores también son modulares, y contienen diversas secuencias cortas de DNA. El intensificador del virus SV40 (que se transcribe dentro de una célula eucariótica) tiene una estructura compleja formada por dos secuencias adyacentes de 72 pb localizadas a unos 200 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Figura 17.6). Cada una de las regiones de 72 pb contiene cinco secuencias que contribuyen a alcanzar la máxima tasa de transcripción. Si se deleciona cualquiera de estas regiones, no se produce ningún efecto en la transcripción; pero si se delecionan ambas, la transcripción *in vivo* se reduce enormemente.

Los intensificadores se diferencian de los promotores en diversas características importantes. Aunque las secuencias promotoras son esenciales para el nivel de transcripción basal, los intensificadores son necesarios para lograr el máximo nivel de transcripción. Además, los intensificadores son los responsables de la expresión génica específica tisular y temporal. Puesto que los intensificadores pueden estimular los niveles de transcripción desde cierta distancia, una pregunta intrigante es cómo pueden hacerlo. Como veremos, los intensificadores realizan al menos dos funciones. En primer lugar, se unen a los factores de transcripción, los cuales alteran la configuración de la cromatina; segundo, estos factores doblan o hacen lazos en el DNA para juntar los intensificadores distantes y los promotores, lo que permite la formación de complejos entre los factores de transcripción y las polimerasas. En su nueva configuración, la transcripción se estimula hasta su nivel más alto, incrementando la tasa total de síntesis de RNA.

17.4 La transcripción en los eucariotas precisa de diversos pasos

Como se ha mencionado, la activación de la transcripción en los eucariotas se realiza en diversos pasos. El primer paso es la remodelación de la cromatina para abrir el DNA y hacerlo accesible a la transcripción. Una vez se ha abierto el DNA, los factores de transcripción y la RNA polimerasa se unen a las regiones promotoras del DNA, formando el complejo de iniciación de la transcripción. En esta sección se describen los sucesos de remodelación de la cromatina, y en la siguiente sección se detallan los sucesos moleculares de la iniciación de la transcripción.

La transcripción precisa la remodelación de la cromatina

En los cromosomas eucarióticos, el DNA se combina con proteínas histónicas y no histónicas para formar la cromatina. Algunas regiones cromosómicas están fuertemente condensadas en el núcleo interfásico, formando heterocromatina transcripcionalmente inerte. Los investigadores han demostrado que los genes que se encuentran en las regiones transcripcionalmente inertes de la cromatina son relativamente resistentes a la digestión *in vitro* con DNasa I. En cambio, la cromatina de las regiones eucromáticas tiene una configuración abierta, y es sensible a la digestión con DNasa I. los genes de estas regiones pueden transcribirse.

Estos niveles de organización de la cromatina reflejan del orden superior de estructura de los nucleosomas, las unidades básicas repetidas de la cromatina. (En el Capítulo 12 se discuten los nucleosomas y la estructura de la cromatina.) Los cambios en la organización de la cromatina, denominados **remodelación de la cromatina**, son esenciales para muchos procesos, incluyendo la unión de las polimerasas y la iniciación de la transcripción (Figura 17.7), así como también para la replicación, la reparación y la recombinación del DNA.

La remodelación de la cromatina implica un cambio en la interacción entre el DNA y las histonas en los nucleosomas. Cuando se termina la remodelación, las secuencias promotoras quedan libres de histonas y son accesibles a las proteínas que inician la transcripción. La remodelación de la cromatina es realizada por un grupo diverso de complejos proteicos con actividad ATPasa. Uno de los complejos de remodelación mejor estudiados en el complejo **SWI/SNF**. Es un gran complejo de 11 subunidades que fue descrito inicialmente en la levadura y que posteriormente se encontró que estaba ampliamente

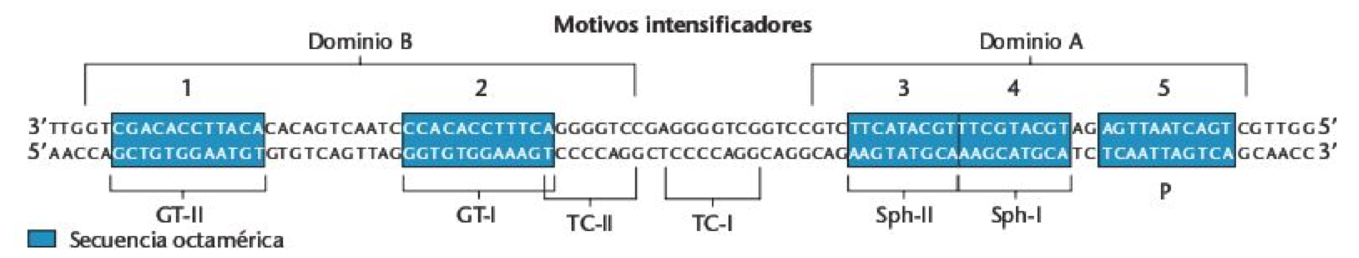


FIGURA 17.6 Secuencia de DNA del intensificador de SV40. Las secuencias sombreadas son las necesarias para que el efecto intensificador sea máximo. Los corchetes que hay debajo de la secuencia indican los diferentes motivos de la secuencia en esta región. También se indican los dos dominios del intensificador (A y B).

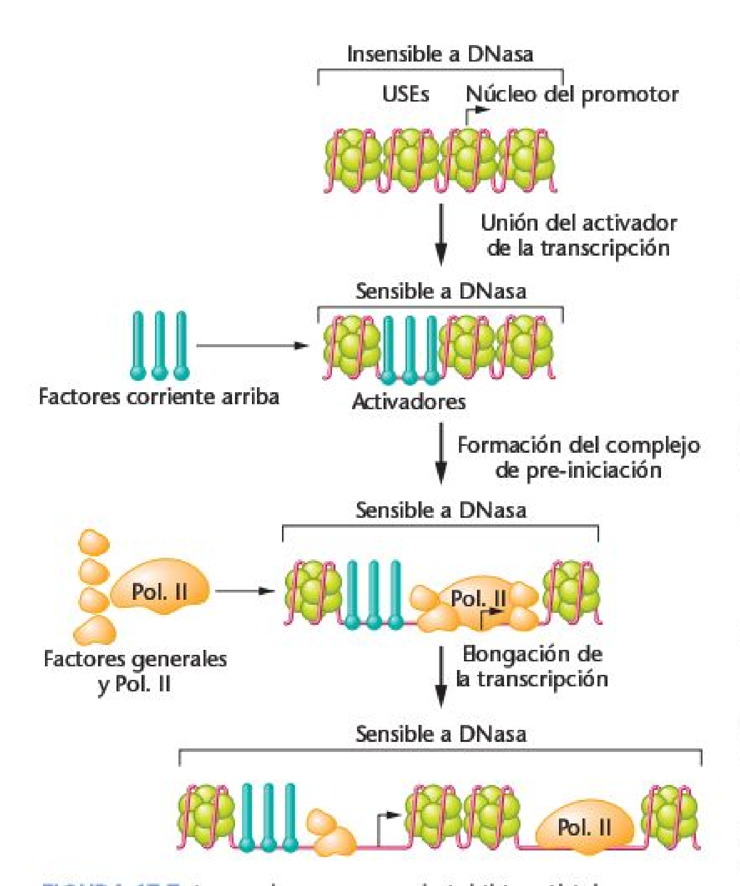


FIGURA 17.7 Los nucleosomas puede inhibir múltiples pasos requeridos para la transcripción génica. La unión de los factores de transcripción intensificadores requiere el acceso al DNA del nucleosoma, y puede provocar el desplazamiento del mismo. Del mismo modo, los nucleosomas también suprimen la formación del complejo de transcripción basal en la caja TATA, otros elementos corriente arriba (USE) y el núcleo del promotor.

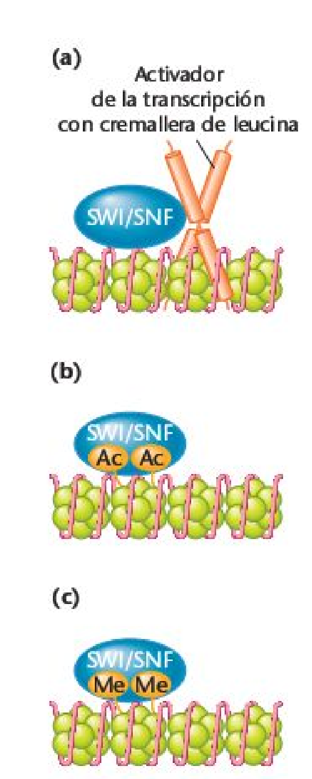
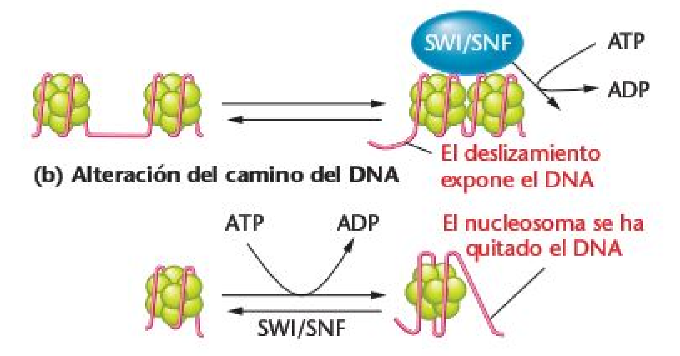


FIGURA 17.8 Los complejos de remodelación del nucleosoma SWI/SNF pueden dirigirse a sitios específicos del DNA de diversas maneras. (a) Factores de transcripción, como los que tienen cremalleras de leucina, pueden domiciliar la unión. (b) Los componentes histónicos del nucleosoma modificados por acetilación pueden servir de diana de SWI/SNF. (c) Las regiones metiladas de DNA también pueden ser dianas para los complejos de remodelación del nucleosoma.

distribuido en los otros eucariotas, incluidos los humanos. Una de sus subunidades contiene un dominio que permite una unión no específica al DNA, y otra es una ATPasa. Originalmente las proteínas de este complejo se identificaron como activadores transcripcionales, ya que su acción conduce a la activación del promotor. Los complejos de remodelación de los nucleosomas pueden domiciliarse en sitios específicos de diversas maneras [Figura 17.8(a)]. Los activadores de la transcripción, incluyendo los que contienen dominios denominados cremalleras de leucina (que se describen a continuación), pueden dirigir la unión del complejo SWI/SNF. Otras posibles maneras de domiciliar estos complejos implica su unión y estabilización por histonas acetiladas [Figura 17.8(b)], o uniéndose a DNA metilado [Figura 17.8(c)]. (La metilación del DNA se discute más adelante en este mismo capítulo.)

Los complejos de remodelación de nucleosomas pueden alterar la estructura de los nucleosomas mediante diversos mecanismos diferentes. Como se ve en la Figura 17.9(a), esto puede conllevar la alteración de los contactos entre el DNA y las proteínas histónicas de los nucleosomas, lo que provoca que el nucleosoma se deslice por la molécula de DNA. Alternativamente, puede alterarse el camino seguido por el DNA alre-



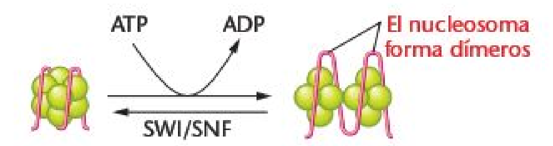


FIGURA 17.9 Tres mecanismos que puede usar el complejo SWI/SNF dependiente de hidrólisis de ATP para alterar la estructura de los nucleosomas. (a) Se pueden perder los contactos DNA-histona. (b) Se puede alterar el camino que sigue el DNA alrededor de un nucleosoma no alterado. (c) Se puede alterar la conformación de la partícula central del nucleosoma.

dedor de la partícula central del nucleosoma, lo que empuja al DNA fuera del nucleosoma, como se ve en la Figura 17.9(b). Otra posibilidad es que se pueda alterar la estructura de la partícula central del nucleosoma, produciendo un nucleosoma dimérico, como se ve en la Figura 17.9(c).

La modificación de las histonas es parte de la remodelación de la cromatina

Un segundo mecanismo de alteración de la cromatina es la modificación de las histonas. La alteración química del componente histónico de los nucleosomas es catalizado por las **enzimas histona acetiltransferasas** (**HAT**). Cuando se añade un grupo acetato a un aminoácido básico específico en las colas de las histonas, disminuye la atracción entre la proteína histónica básica y el DNA ácido (Figura 17.10). Como en el caso de los complejos de remodelación, los HAT son domiciliados a los genes por factores de transcripción específicos. La remodelación de una región de cromatina que contenga un gen implica la interacción entre un complejo de remodelación y un HAT. Por supuesto, todo lo que puede abrirse también puede cerrarse. En este caso, las **histona desacetilasas** (**HDAC**) pueden eliminar los grupos acetato de las colas de las histonas. Típicamente, desde la óptica de un intensificador, la remodelación se propaga desde el promotor del gen hacia la unidad transcripcional. Para evitar la propagación de la remodelación a los genes vecinos, hay unas cortas secuencias de DNA denominadas **elementos aislantes** que se unen a proteínas específicas que pueden actuar de barrera. Además de la acetilación, las histonas pueden modificarse mediante fosforilación y metilación. Estas alteraciones estructurales se producen en residuos aminoacídicos específicos de las histonas. Esta observación condujo a la propuesta que patrones específicos y reversibles de modificación covalente de las histonas producen la activación o el silenciamiento génico. Según esta idea, estos patrones de modificaciones mediadas por enzimas constituyen una serie de señales conocidas como el **código de las histonas**, un mecanismo de regulación que altera la conformación de la cromatina y, a la vez, la actividad génica. Actualmente se han acumulado algunas pruebas de que las modificaciones histónicas específicas sirven de sitio de unión para las proteínas implicadas en la regulación génica.

El énfasis de esta sección es en la remodelación que abre la cromatina y permite que las regiones promotoras sean accesibles a la unión de los factores de transcripción que inician la cadena de sucesos asociados a la transcripción.

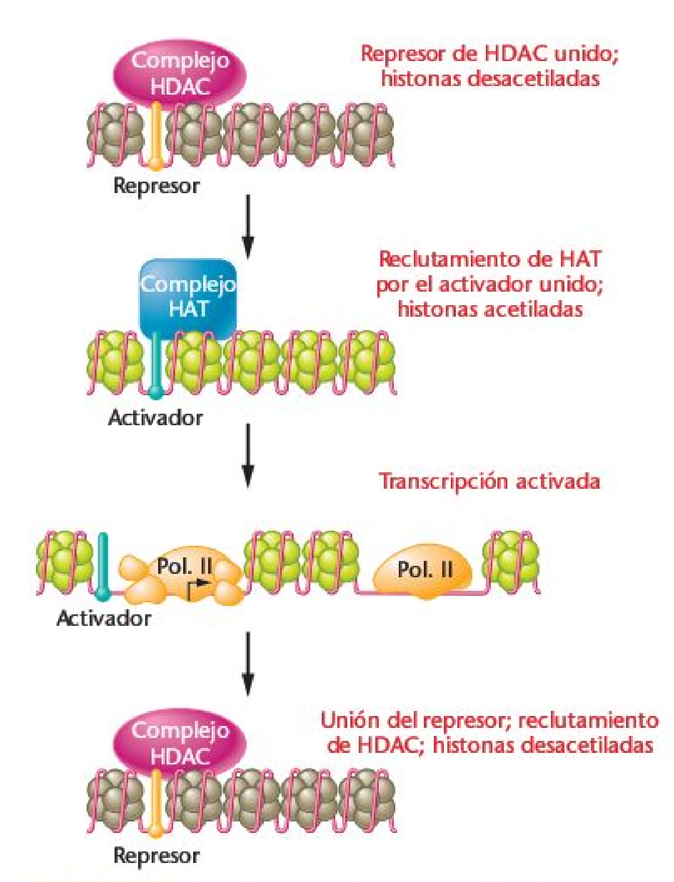


FIGURA 17.10 Modelo propuesto de la acción de los complejos HAT y HD. Los factores de transcripción reclutan el complejo para el gen, que tanto añade como elimina grupos acetilo, lo que contribuye a la apertura y al cierre de la estructura de la cromatina.

17.5 El ensamblaje del complejo de transcripción basal se produce en el promotor

El control transcripcional en eucariotas implica la interacción entre secuencias de DNA adyacentes a las regiones promotoras y proteínas de unión a DNA. Se han identificado, cartografiado y secuenciado las secuencias reguladoras adyacentes de una amplia gama de genes. Para aislar los factores de transcripción presentes en concentraciones muy bajas se han utilizado cromatografías de afinidad y pruebas de protección de secuencias de DNA y geles de retardo en extractos celulares. El resultado ha sido una explosión virtual de información sobre los factores de transcripción eucarióticos. Esta sección expondrá parte de esta información, incluyendo las características de los factores de transcripción, sus interacciones con las secuencias de DNA, la implicación de otros factores de regulación y la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa.

Las RNA polimerasas y la transcripción

Los genes eucarióticos usan tres RNA polimerasas para la transcripción (todos los genes procarióticos son transcritos por una única RNA polimerasa.) Estas polimerasas son las de tipo I (para el RNA ribosómico), de tipo II (para los mRNA y los snRNA) y las de tipo III (para los tRNA, el rRNA 5S y otros RNA celulares pequeños). El promotor para cada tipo de poli-

merasa tiene una secuencia nucleotídica diferente y se une a diferentes factores de transcripción. Esta exposición se restringirá a los sucesos asociados a los genes transcritos por la RNA polimerasa II.

La formación del complejo de iniciación de la transcripción

Una colección de proteínas denominadas **factores de transcripción basales** o **generales** actúan en *trans* para controlar la iniciación de la transcripción. Estas moléculas no forman parte de la molécula de RNA polimerasa II, pero se ensamblan en el promotor en un orden específico formando el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC), que proporciona una plataforma para que la polimerasa reconozca el promotor y se una a él (Figura 17.11). Para que se inicie la formación del complejo de transcripción, un complejo proteico denominado TFIID se une a la caja TATA a través de una de sus subunidades, denominada TBP (proteína de unión a TATA, del inglés *TATA binding protein*) (Figura 17.12). El complejo TFIID está formado por TBP y por aproximadamente otras 13 proteínas más, denominadas TAF (factores asociados a TBP, del inglés *TATA associated factors*). Unos 20 pares de bases del DNA están implicados en la unión a TBP y a las otras subunidades del factor de transcripción TFIID.

TFIID responde al contacto de proteínas activadoras con cambios conformacionales que facilitan la unión de otros factores adicionales, como TFIIB. TFIIB es una proteína que interacciona con TBP y con secuencias de DNA corriente arriba de TATA. Entonces se unen TFIIA, la RNA polimerasa II y otros factores adicionales, como TFIIF, a lo que sigue la unión de TFIIE, TFIIH y TFIIJ. En el estadio final, la RNA polimerasa deja la caja TATA, y se produce la transcripción del gen adyacente a un nivel *basal*.

Además de los factores de transcripción general que forman la plataforma para la unión de la RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción a nivel basal, hay otros factores de trascripción que se unen a los sitios intensificadores y afectan la tasa de transcripción. Estas proteínas pueden actuar como *factores positivos* para incrementar la transcripción (activadores),

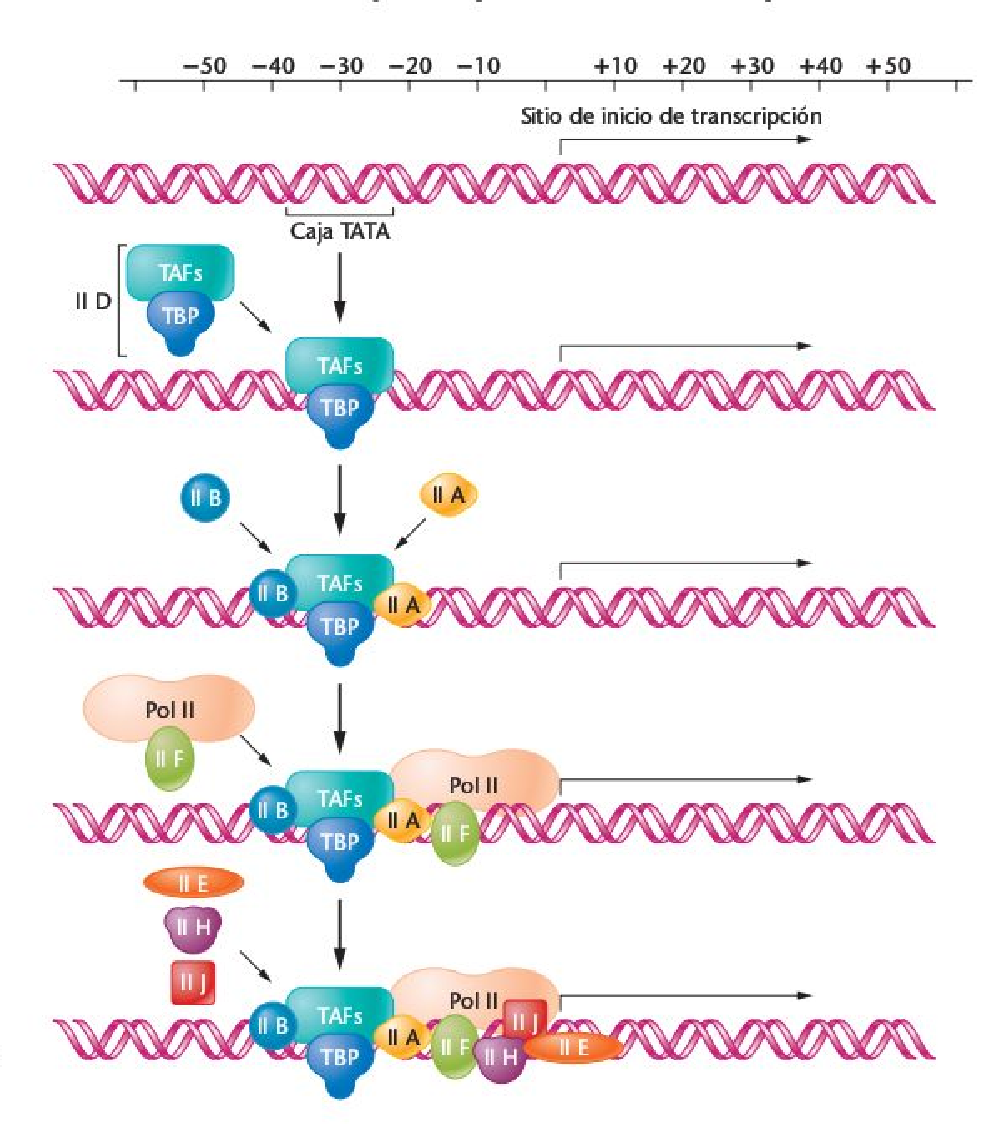


FIGURA 17.11 Ensamblaje de los factores de transcripción necesarios para la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II.

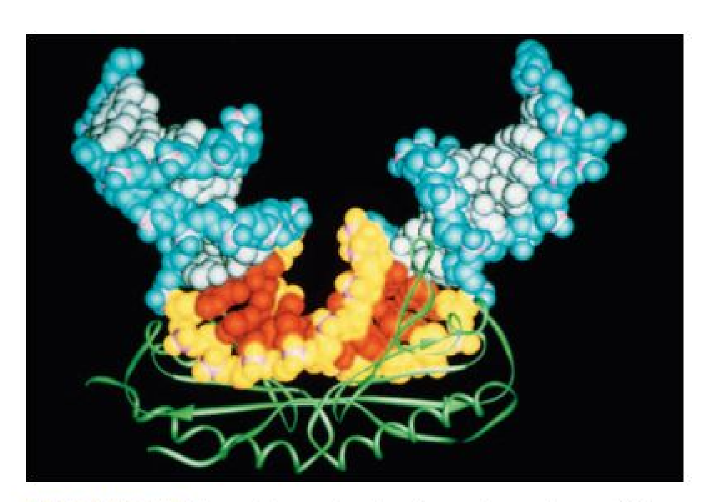


FIGURA 17.12 Complejo molecular formado por la proteína de unión a TATA (en verde) y las 8 pb de la secuencia nucleotídica de la caja TATA (en rojo), y su esqueleto fosfodiéster (en amarillo).

o como *factores negativos* (represores) para disminuir la transcripción. Estas proteínas controlan dónde y cuándo se expresan los genes, y su tasa de expresión. Los activadores se unen al intensificador e interaccionan con el complejo de transcripción en el promotor, y pueden incrementar la tasa de transcripción hasta cien veces.

Los activadores se unen a los intensificadores y cambian la tasa de iniciación de la transcripción

Los **activadores** son proteínas modulares que se unen a las secuencias de DNA intensificadoras formando un complejo conocido como **complejo de intensificación** (Figura 17.13). Una vez formado, las proteínas del complejo de intensificación interaccionan con proteínas del complejo de transcripción. Para lograrlo, los activadores tienen dos dominios funcionales (grupos de aminoácidos que desempeñan una función específica). Un dominio se une a las secuencias de DNA presentes en el intensificador (**dominio de unión al DNA**), y otro activa la transcripción mediante una interacción proteína-proteína (**dominio de activación en *trans***). El dominio de activación en *trans* se une a la RNA polimerasa o a otros factores de transcripción en el promotor. La existencia de dominios separados en los factores de transcripción eucarióticos se demostró por primera vez mediante el análisis genético de mutantes de levadura. Los dominios de los factores de transcripción eucarióticos presentan varias formas. Los dominios de unión al DNA tienen patrones estructurales característicos o **motivos**. Hay diversas clases de motivos, como la **hélice-giro-hélice** (**HTH**, del inglés *helix-turn-helix*), los dedos de zinc y las cremalleras básicas de leucina (bZIP, del inglés *basic leucine zipper*). Esta enumeración no es exhaustiva, y sin duda se establecerán otros grupos nuevos al caracterizarse nuevos factores.

El primer dominio de unión a DNA que se descubrió fue el motivo hélice-giro-hélice (HTH). Este motivo, que también se encuentra en procariotas, se caracteriza por su conformación geométrica en vez de por una secuencia aminoacídica característica (Figura 17.14). Este motivo tiene dos hélices α adyacentes separadas por un «giro» de varios aminoácidos, lo que permite que la proteína se una a DNA (y de ahí proviene el nombre del motivo). A diferencia de otros motivos de unión a DNA, el patrón HTH no puede plegarse o funcionar solo, sino que siempre forma parte de un dominio de unión a DNA mayor. Los residuos aminoacídicos que están fuera del motivo HTH son importantes para la regulación del reconocimiento y de la unión al DNA.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo nos hemos dado cuenta que los factores transcripción tienen múltiples dominios de unión?

El potencial de formar la geometría de hélice-giro-hélice se ha encontrado en diferentes regiones de un gran número de genes eucarióticos que se sabe que regulan los procesos de desarrollo. La **caja homeótica (*homeobox*)**, una secuencia de 180 pb que especifica una secuencia de 60 aminoácidos denominada **dominio homeótico (homeodominio)** que puede for-

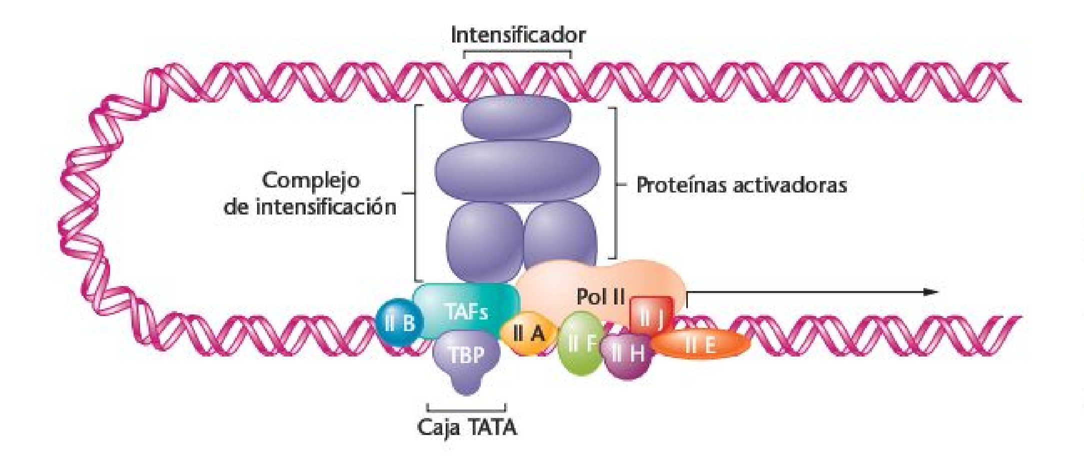


FIGURA 17.13 La formación de lazos en el DNA permite que los factores que se unen a los intensificadores a cierta distancia del promotor interaccionen con las proteínas reguladoras del complejo de transcripción y maximicen la transcripción.

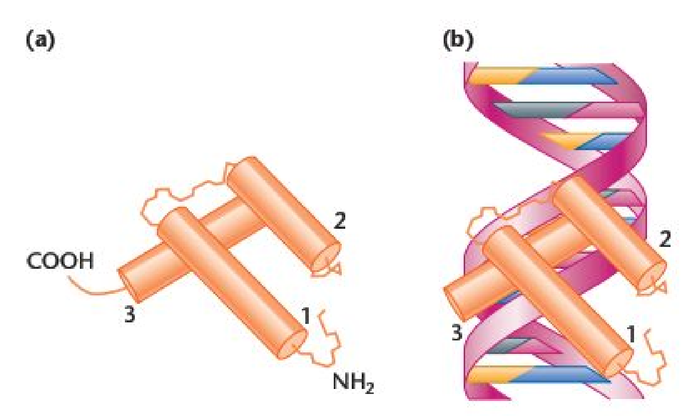


FIGURA 17.14 *Hélice-giro-hélice* o *dominio homeótico* en el que (a) se establecen los tres planos diferentes de las hélices a de la proteína, y (b) estos dominios se unen a los surcos de la molécula de DNA.

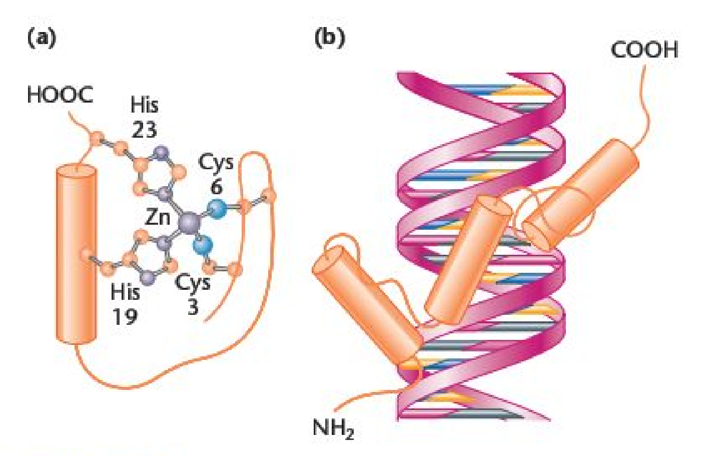


FIGURA 17.15 (a) Dedo de zinc en el que los residuos de cisteína e histidina se unen a un átomo de Zn^{++}. (b) Esto hace que la cadena aminoacídica se doble en una configuración parecida a un dedo.

mar una estructura HTH, está presente en caso todos los organismos eucarióticos. De los 60 aminoácidos, muchos son básicos (arginina y lisina), y hay una secuencia conservada entre todos estos genes. Debido a su importancia durante los procesos de desarrollo de los animales, discutiremos los genes que contienen caja homeótica en el Capítulo 23.

El motivo **dedo de zinc** se descubrió originalmente en el factor de transcripción TFIIIA de la rana *Xenopus laevis*. Actualmente, este motivo estructural se ha identificado en protooncogenes (Capítulo 18), en genes que regulan el desarrollo de *Drosophila* (gen *Krüppel*, véase el Capítulo 23), en proteínas cuya síntesis se induce mediante factores de crecimiento y señales de diferenciación, y en factores de transcripción. Las proteínas con dedos de zinc representan una de las familias más importantes de factores de transcripción eucarióticos, y están implicados en muchos aspectos de la regulación génica. Hay varios tipos de proteínas con dedos de cinc, cada una de ellas con un patrón estructural característico.

Una proteína típica con dedos de cinc contiene grupos de dos residuos de cisteína y de dos residuos de histidina a intervalos repetidos (Figura 17.15). La repetición aminoacídica consenso es $CysN_{2-4}CysN_{12-14}HisN_3His$ (donde N es cualquier aminoácido). Los residuos de cisteína y de histidina unen átomos de cinc covalentemente, plegando los aminoácidos en lazos conocidos como dedos de cinc. Cada dedo está formado por 23 aminoácidos aproximadamente, con un lazo de 12 a 14 aminoácidos entre los residuos cys e his, y con una unión entre lazos formada por 7 u 8 aminoácidos. Los aminoácidos del lazo interaccionan con secuencias específicas del DNA y se unen a ellas. Las investigaciones han demostrado que los dedos de cinc se unen al surco mayor del DNA y envuelven, al menos en parte, el DNA. Dentro del surco mayor, los dedos de cinc establecen contactos con un grupo de bases del DNA, y muchos forman puentes de hidrógeno con un grupo de bases, especialmente en cadenas ricas en G. El número de dedos en un factor de transcripción con dedos de cinc varía de 2 a 13, así como la longitud de la secuencia de unión del DNA.

Un tercer tipo de dominio de unión a DNA es el de las **cremalleras básicas de leucina** (**bZIP**). Este dominio de unión al DNA se encuentra adyacente a una **cremallera de leucina**, una región que permite la dimerización proteína-proteína. La cremallera de leucina tiene cuatro residuos de leucina separados por siete aminoácidos, y está flanqueado por aminoácidos básicos. Esta región forma una hélice con los residuos de leucina sobresaliendo en cada vuelta. Cuando dimerizan dos de estas moléculas, los residuos de leucina se «cierran» como una cremallera (Figura 17.16). El dímero contiene dos regiones de hélice α adyacentes a la cremallera que se unen a los residuos fosfato y a bases específicas del DNA, haciendo que el dímero se parezca a unas tijeras.

Los factores de transcripción también contienen dominios que interaccionan con las proteínas del complejo de transcripción basal y que controlan la tasa de iniciación de la transcripción. Estos dominios de activación en *trans*, que son diferentes a los dominios de unión al DNA, pueden ocupar de 30 a 100 aminoácidos. Estos trechos de aminoácidos interaccionan con otros factores de transcripción (como los que se unen al promotor) o interaccionan directamente con la RNA polimerasa. (Véase la Figura 17.13.) Además, muchos factores de transcripción también contienen dominios que se unen a **coactivadores**, como hormonas o pequeños metabolitos que regulan su actividad.

En conjunto, la imagen de la regulación transcripcional en eucariotas es compleja, pero se pueden extraer algunas generalidades importantes. En primer lugar, se considera que la organización estructural de la cromatina y las alteraciones de esta estructura que permiten la unión de los factores de transcripción representan el primer nivel de regulación. Segundo, la regulación de la transcripción por factores proteicos es mayoritariamente positiva, aunque actualmente se están reconociendo represores de la transcripción como componentes importantes de la regulación génica.

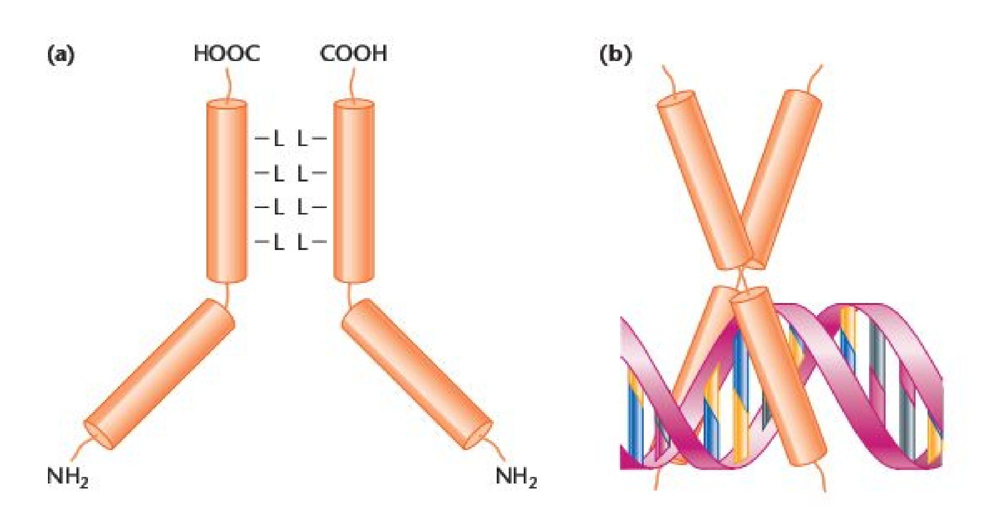


FIGURA 17.16 (a) La cremallera de leucina es el resultado de la presencia de dímeros de leucina encarados en dos cadenas polipeptídicas en cada vuelta de la hélice a. (b) Cuando las regiones de hélice a forman una cremallera de leucina, las regiones que hay más allá de la cremallera forman una región en forma de Y que sujeta el DNA mediante una configuración semejante a unas tijeras.

Además, diversos factores de transcripción pueden competir para unirse a una secuencia de DNA concreta o a dos secuencias solapadas, o el mismo sitio podría unir diferentes factores en dos tejidos diferentes. La concentración de los factores de transcriptción y la fuerza con que cada uno de ellos se une al DNA determinarán qué factor es el que se une. Finalmente, debido a la variabilidad en la localización y a la naturaleza modular de los intensificadores, y debido también a la variedad de factores de transcripción, el complejo de iniciación del promotor puede interaccionar con múltiples intensificadores, con proteínas individuales que contactan con el complejo de transcripción basal en el promotor de diversas maneras, implicando siempre interacciones proteína-proteína.

Ahora resuelva esto

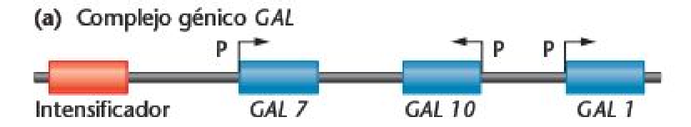
La Pregunta 17.13 de la página 497 le pide que dibuje un esquema de cómo el superenrollamiento afecta los intensificadores.

Sugerencia: Recuerde que los cambios en la conformación de la cromatina y la posición de los elementos asociados a la actuación de los intensificadores también son factores importantes.

17.6 La regulación génica en un organismo modelo: inducción positiva y represión por catabolito en los genes gal de levadura

Uno de los primeros sistemas modelo utilizado para estudiar la regulación genética en los eucariotas fueron los genes de levadura que codifican las enzimas para la degradación de la lactosa. Estos genes *gal* realizan una función parecida a la de los operones *lac* y *ara* en *E.coli*. La expresión de los genes *gal* es **inducible**; es decir, son regulados por la presencia y la ausencia de su substrato, la galactosa. En ausencia de galactosa, estos genes no se transcriben. Si se añade galactosa al medio de cultivo, la transcripción empieza inmediatamente, y la concentración de mRNA de estos transcritos se incrementa mil veces. Sin embargo, la transcripción solo se activa si la concentración de glucosa es baja. O sea que, como en los operones *lac* y *ara*, los genes *gal* presentan un segundo nivel de control, la **represión por catabolito**. (Véase el capítulo 16.) Una mutación en el regulador de los genes *gal*, denominado *GAL4*, evita la activación, lo que indica que la transcripción se encuentra bajo **control positivo**; es decir, el regulador debe estar presente para conectar la transcripción génica. La represión por catabolito en levadura es diferente que en bacterias. En levadura, a diferencia de en bacterias, este fenómeno implica una enzima (una proteína quinasa) y no implica AMP cíclico. Examinaremos cómo se regulan dos de estos genes, *GAL1* y *GAL10* (Figura 17.17).

La transcripción de estos dos genes está controlada por una región de control central, denominada **UAS**$_G$ (secuencia activadora corriente arriba, del inglés *upstream activator sequence*). Recuerde que las UAS son funcionalmente parecidas a los intensificadores de los eucariotas superiores. La estructura de la cromatina de los UAS está abierta de manera constitutiva, por lo que es **hipersensible a la DNasa**, lo que significa que no está asociada a nucleosomas. Esta estructura abierta de la cromatina requiere la acción del complejo de remodelación SWI/SNF. En los UAS hay cuatro sitios de unión para la proteína Gal4 (Gal4p). Estos sitios están permanentemente ocupados por Gal4p, tanto si los genes *gal* has sido activados como si no. A su vez, Gal4p es negativamente regulada por Gal80p, otro regulados génico de *gal*. Gal80p se encuentra siempre unida a Gal4p cubriendo su dominio de activación, que se muestra en la Figura 17.17 como una mancha negra. La inducción se produce cuando el inductor, la galactosa fosforilada, se une a Gal80p o a Gal4p (o a ambas) y causa una alteración estructural, que hace que el dominio de activación de Gal4 quede expuesto. Como en *E. coli*, estos genes se encuentran bajo un segundo nivel de control, la represión por catabolito, y por ello



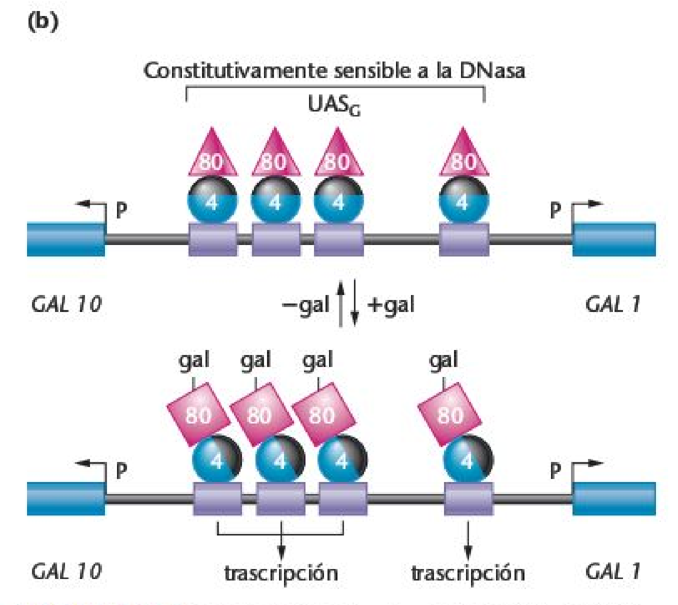
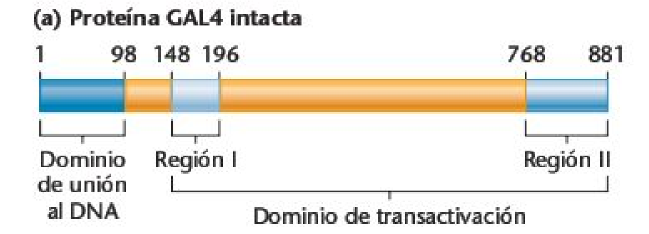


FIGURA 17.17 Modelo de las estructuras de *GAL1* y *GAL10* que muestran los sitios de unión para el regulador positivo Gal4p y su interacción con el regulador negativo Gal80p. Se muestra inducción cuando se altera la estructura de Gal80p, lo que expone el dominio de activación de Gal4p.



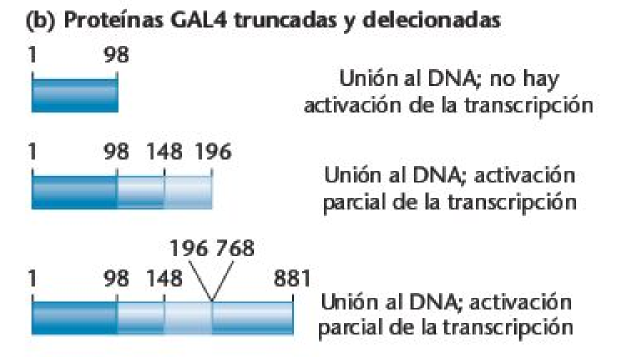


FIGURA 17.18 La proteína Gal4p tiene tres dominios que participan en la activación de los loci *GAL1* y *GAL10*. Los aminoácidos 1 a 98 se unen los sitios de reconocimiento del DNA en UAS_G. Los aminoácidos 148 a 196 y 768 a 881 son requeridos para la activación de la transcripción. La actividad de unión de Gal80p reside en la región aminoacídica 851-881.

no se pueden activar en presencia de glucosa. En este caso, sin embargo, el catabolito no opera a través de cAMP, sino a través de un sistema complejo que implica una proteína quinasa. Durante la activación se reclutan otros factores de transcripción que remodelan todavía más la cromatina, rodeando los dos promotores y exponiendo sus cajas TATA a TBP.

Gal4p es una proteína formada por 881 aminoácidos que incluye un dominio de unión a DNA que reconoce y se une a secuencias de las UAS_G, y un domino de activación en *trans* que activa la transcripción [Figura 17.18(a)]. Estos dominios funcionales se identificaron mediante la clonación y la expresión de genes *GAL4* truncados, y analizando la capacidad de unión al DNA y la capacidad de activar la transcripción. Puesto que la proteína contiene dos dominios funcionales, la deleción de una de estas regiones permite que la otra quede intacta y funcional.

El análisis mutacional identificó el dominio de unión a DNA como la región N-terminal de la proteína. Esta región reconoce y se une a secuencias nucleotídicas de las UAS_G. Las proteínas con deleciones que abarcan desde el aminoácido 98 al extremo C-terminal (aminoácido 881) mantienen la capacidad de unirse a la región UAS_G. Experimentos parecidos han identificado dos regiones de la proteína implicadas en la activación de la transcripción: la región I (formada por los aminoácidos 148-196) y la región II (formada por los aminoácidos 768-881). Las construcciones que contienen el dominio de unión a DNA (aminoácidos 1-96) y la región I (aminoácidos 149-196), o el dominio de unión a DNA y la región II (aminoácidos 768-881), tienen una actividad transcripcional reducida [Figura 17.18(b)].

Para explorar las características de estas regiones de activación, los investigadores empezaron con una proteína que contenía la región de unión a DNA y la región activadora I (GAL4 1-238), y aislando mutaciones puntuales de la región I que resultaban en un incremento de la activación. La mayoría de las mutaciones simples que incrementan la activación producen sustituciones aminoacídicas que incrementan la carga negativa de la región I, e incrementan la transcripción por un factor de tres. Un mutante múltiple que contiene cuatro cargas negativas más que la proteína inicial provoca un incremento de nueve veces más en la activación de la transcripción, y tiene casi el 80 por ciento de actividad respecto a la Gal4p completa. Sin embargo, la carga negativa no es el único factor responsable de la activación; algunos mutantes con actividad transcripcional disminuida aproximadamente el mismo número de cargas negativas que la molécula GAL4 1-238 parental.

Estos resultados sugieren firmemente que la activación implica el contacto directo entre el dominio de activación del factor de transcripción y otras proteínas. ¿Cómo activa la transcripción esta interacción proteína-proteína? Hay varias posibilidades, que incluyen la remodelación de la cromatina, la estabilización de la unión entre el DNA del promotor y la RNA

polimerasa, el incremento de la tasa de desenrollamiento de la doble cadena de DNA de la región transcrita, la aceleración de la liberación de la RNA polimerasa del promotor o la atracción y la estabilización de otros factores que se unen al promotor o a la RNA polimerasa.

Un candidato atractivo a diana de la activación es TFIID, un complejo de varias proteínas que contiene la proteína de unión a TATA (TBP) y otros 13 TAF. La idea de que TFIID es la diana para la activación se apoya en el descubrimiento de que algunas construcciones *GAL4* estimulan la transcripción en extractos de células de mamífero y cambian la conformación de TFIID unido a DNA. Además, otras investigaciones muestran que aunque TBP puede unirse al promotor, para que el complejo responda a los activadores los TAF también deben estar presentes (como se muestra en la Figura 17.13).

17.7 La metilación del DNA y la regulación de la expresión génica

La alteración de la conformación de la cromatina es una de las maneras de regular la expresión génica en los eucariotas. En esta sección consideraremos otro mecanismo que desempeña una función en la regulación génica: la modificación química del DNA mediante la adición o la eliminación de grupos metilo a las bases del DNA.

Después de replicarse, el DNA de la mayoría de los organismos eucarióticos se modifica mediante la adición enzimática de grupos metilo a la bases y a los azúcares. La metilación de bases implica, en la mayoría de casos, la adición de grupos metilo a la citosina. Sin embargo, el grado de metilación puede ser específico de tejido, y puede variar de menos del 2 por ciento a más del 7 por ciento. Investigaciones del operón *lac* de *E. coli* han dado a conocer la capacidad de la metilación de bases de alterar la expresión génica. La metilación del DNA en la región operadora, incluso de un solo residuo de citosina, puede causar un notable cambio en la afinidad del represor por el operador. La metilación de la citosina se produce en posición 5′ de la base citosina, lo que provoca que el grupo metilo sobresalga en el surco mayor de la doble hélice de DNA, donde altera la unión de proteínas al DNA. La metilación se produce, generalmente, en la citosina de dobletes CG del DNA, normalmente en ambas cadenas:

$$5'\text{—}{}^{m}\text{CpG—}3'$$
$$3'\text{—GpC}^{m}\text{—}5'$$

El estado de metilación del DNA puede determinarse por análisis con enzimas de restricción. La enzima *Hpa*II corta la secuencia de reconocimiento CCGG; sin embargo, si la segunda citosina está metilada, la enzima no cortará el DNA. La enzima *Msp*I corta en el mismo sitio CCGG tanto si la segunda citosina está metilada como si no lo está. Si un segmento de DNA no está metilado, ambas enzimas producen el mismo patrón de restricción de bandas. Como se muestra en la Figura 17.19, si un sitio está metilado la digestión con *Hpa*II produce un patrón de fragmentos alterado. La utilización de éste método para analizar la metilación de un gen determinado en diferentes tejidos muestra que, en general, si un gen se expresa, no está metilado o tiene un nivel de metilación bajo.

La prueba de la función de la metilación en la expresión de genes eucarióticos es indirecta y se basa en diversas observaciones. Primero, hay una relación inversa entre el grado de metilación y el grado de expresión. Es decir, niveles bajos de metilación se asocian a niveles altos de expresión génica, y niveles altos de metilación se asocian a niveles bajos de expresión génica. En las hembras de los mamíferos, el cromosoma X inactivado, que es casi totalmente inactivo, tiene un nivel de metilación superior al cromosoma X activo. Dentro del cromosoma X inactivo, aquellas regiones que escapan de la inactivación tienen unos niveles de metilación mucho más bajos que los observados en regiones adyacentes inactivas.

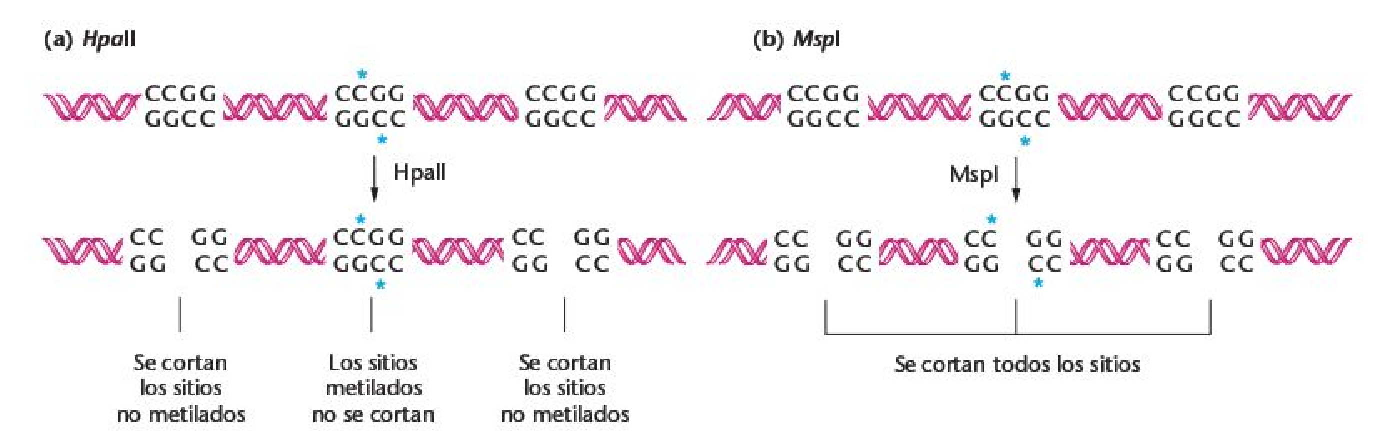


FIGURA 17.19 Las enzimas de restricción *Hpa*II y *Msp*I reconocen y cortan las secuencias CCGG. (a) Si la segunda citosina está metilada (indicado por un asterisco), *Hps*II no cortará la secuencia. (b) La enzima *Msp*I corta todos los sitios CCGG, tanto si la segunda citosina está metilada como si no lo está. Así, el estado de metilación de un gen concreto en un tejido dado puede determinarse cortando DNA extraído de ese tejido con *Hpa*I y con *Msp*II.

Segundo, los patrones de metilación son específicos de tejido y, una vez establecidos, se heredan en todas las células de ese tejido. Quizá, la prueba más firme de la función de la metilación en la expresión génica provenga de investigaciones en que se utilizan análogos de bases. El nucleótido 5′-azacitidina se incorpora en el DNA en lugar de la citidina y no puede metilarse (Figura 17.20), lo que provoca un nivel de metilación inferior en los sitios donde se incorpora. La incorporación de la 5′-azacitidina causa cambios en el patrón de expresión génica y puede estimular la expresión de los alelos del cromosoma X inactivado.

La 5′-azacitidina está siendo utilizada en pruebas clínicas para el tratamiento de la anemia falciforme. En esta enfermedad autosómica recesiva, una proteína de hemoglobina mutante con una β-globina defectuosa provoca cambios en la forma de los glóbulos rojos, lo que a su vez genera una cascada de síntomas clínicos. Durante la embriogénesis, se expresan los genes ϵ y γ^g de la globina, pero normalmente dejan de transcribirse después del nacimiento, cuando empieza la síntesis de la β-globina. El tratamiento de los individuos afectados con 5′-azacitidina causa la reducción de la metilación de los genes ϵ y γ^g de la globina, e inicia la reexpresión de estos genes embrionarios y fetales. Las proteínas ϵ y γ reemplazan a la β-globina en las moléculas de hemoglobina, lo que ocasiona una disminución de la forma de hoz de los glóbulos rojos.

Aunque las pruebas disponibles indican que la ausencia de grupos metilo en el DNA se relaciona con un incremento de la expresión génica, la metilación no puede considerarse como un mecanismo general de regulación génica porque la metilación no es un fenómeno general en los eucariotas. En *Drosophila*, por ejemplo, el DNA no se metila. Por eso, la metilación sólo puede representar una de las diversas maneras mediante las que los cambios genómicos pueden regular la expresión génica, y parece probable que todavía queden por descubrir mecanismos parecidos.

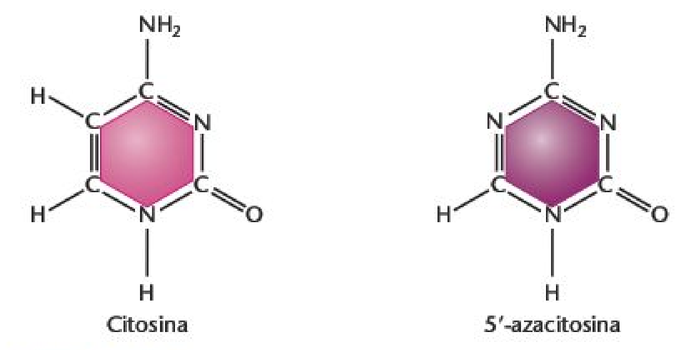


FIGURA 17.20 La base 5′-azacitosina, que tiene un nitrógeno en la posición 5′, puede incorporarse durante la síntesis de DNA en lugar de la desoxicitidina. La base 5′-azacitosina no puede metilarse, lo que provoca un nivel inferior de metilación del dinucleótido CpG en todos los sitios en que se haya incorporado.

¿Cómo puede la metilación afectar la regulación génica? Una posibilidad proviene de la observación de que determinadas proteínas se unen a la 5-metilcitosina sin tener en cuenta la secuencia de DNA. Estas proteínas podrían reclutar correpresores o histona desacetilasas (o a ambos) para remodelar la cromatina, cambiándole su estructura de abierta a cerrada, o podrían reclutar complejos de remodelación de nucleosomas.



La Pregunta 17.14 de la página 497 le pide que interprete el efecto de la metilación del DNA en la expresión de un gen.

Sugerencia: Recuerde que la localización de diversas secuencias reguladoras localizadas fuera del gen afectarán los resultados.

17.8 Regulación postranscripcional de la expresión génica

Como hemos visto, la regulación de la expresión génica se puede producir en muchos puntos a lo largo del camino del DNA a la proteína. Aunque el control transcripcional es, quizá, el principal tipo de regulación en eucariotas, en muchos organismos también se produce **regulación postranscripcional**. Los transcritos de RNA nucleares eucarióticos se modifican antes de la traducción, se eliminan los intrones no codificantes, los exones restantes se unen con gran precisión, y el mRNA se modifica mediante la adición de una caperuza en el extremo 5′ y de una cola de poli A en el extremo 3′. Entonces el mensajero es trasportado al citoplasma. Cada uno de estos procesamientos ofrece varias posibilidades de regulación. Vamos a examinar dos que son especialmente importantes en los eucariotas: el corte y empalme alternativo de un transcrito de mRNA para generar múltiples mRNA, y la regulación de la estabilidad del mRNA.

Tipos de procesamiento alternativo del mRNA

El **corte y empalme alternativo** puede generar diferentes formas de mRNA a partir de una única molécula de mRNA, de modo que la expresión de un gen puede generar una familia de proteínas, cuyas funciones pueden ser similares o diferentes. Los cambios en el patrón de corte y empalme pueden tener muchos efectos diferentes sobre la proteína traducida. Los cambios pequeños pueden alterar la actividad enzimática, la capacidad de unión al receptor y la localización de la proteína en la célula. Los cambios en el patrón de corte y empalme son sucesos importantes en el desarrollo, la apoptosis y la conexión entre axones en el sistema nervioso, entre otros muchos procesos. Las mutaciones que afectan el proceso de corte y empalme son la base de diversas enfermedades genéticas.

El corte y empalme alternativo incrementa el número de proteínas que se pueden hacer a partir de un gen. En consecuencia, el número de proteínas que puede hacer una célula (su **proteoma**) no está directamente relacionado con el número de genes del genoma, y la diversidad proteica puede superar el número de genes en un orden de magnitud. El fenómeno de corte y empalme alternativo se encuentra en todos los metazoos, pero es especialmente común en los vertebrados, incluidos los humanos. Ahora que ya se ha secuenciado la porción codificante del genoma humano, la tarea de la era postgenómica es identificar y catalogar todas las proteínas y los mRNA producidos por este genoma, y comprender sus funciones. Se estima que entre el 30 y el 60 por ciento de los genes del genoma humano usan el corte y empalme alternativo. De este modo, los humanos podemos producir varios cientos de miles de proteínas diferentes (o quizás más) a partir de los 25.000 a 30.000 genes aproximadamente que hay en el genoma haploide[1].

La Figura 17.21 ilustra un ejemplo de corte y empalme alternativo en el pre-mRNA de un gen que contiene doce exones. Este RNA presenta diversos sitios de corte y empalme, y puede producir muchos mRNA diferentes. En la célula, copias diferentes de este pre-mRNA pueden cortarse y empalmarse en combinaciones diversas, produciendo simultáneamente muchos mRNA y proteínas diferentes a partir de un único gen. (Recuerde del Capítulo 14 que el corte y empalme alternativo se produce en el complejo de corte y empalme o *spliceosoma*, un complejo molecular que cataliza estos sucesos.)

Corte y empalme alternativo y la función celular

Para entender el significado del corte y empalme alternativo, vamos a examinar el papel que este proceso desempeña en la función de las células ciliares de la cóclea y la recepción del sonido. Para oír los sonidos del mundo que nos rodea, nuestros oídos detectan las ondas sonoras en millares de frecuencias diferentes. Dentro de la cóclea del oído interno, la membrana basilar tiene cuatro hileras de células ciliadas (Figura 17.22). Cada célula responde a una gama de frecuencias diferente y restringida. El corte y empalme alternativo del pre-mRNA del gen *SLO*, que codifica un canal de potasio regulado por calcio, controla al menos en parte que las células ciliares estén convenientemente sintonizadas para recibir las diferentes frecuencias. En la mayor parte de sitios hay un exón que puede ser incluido o excluido, o lo que es lo mismo la mayor parte de exones presentan sitios de corte y empalme alternativos. Si cada sitio se regula de manera independiente, se pueden producir más de 500 mRNA diferentes a partir del transcrito del gen *SLO*. Algunas formas de las proteínas *SLO* tienen diferentes propiedades fisiológicas que pueden desempeñar una función asegurando que podamos oír sonidos a través de una amplia gama de frecuencias.

El corte y empalme alternativo incrementa el número de proteínas producidas por el genoma

Dada la existencia de corte y empalme alternativo, ¿Cuántos polipéptidos diferentes pueden provenir de un mismo pre-mRNA? Una respuesta a esta pregunta proviene del trabajo realizado en un gen de *Drosophila*. Durante el desarrollo, las células del sistema nervioso se deben conectar con precisión entre sí. Incluso en *Drosophila*, que solo tiene 250.000 neuronas, la tarea es formidable. Los axones son las protuberancias celulares que conectan las células nerviosas entre sí. El gen *Dscam* de *Drosophila* codifica una proteína que guía el crecimiento axonal, asegurando que las neuronas se conecten adecuadamente. En el pre-mRNA de Dscam, los exones 4, 6, 9 y 17 presentan una colección de exones posibles (Figura 17.23). Estos exones se cortan y empalman en el mRNA de manera exclusiva, de modo que sólo hay un exón representado de los muchos exones posibles. Hay 12 alternativas para el exón 4; 48 alternativas para el exón 6; 33 alternativas para el exón 9; y 2 alternativas para el exón 17. Si se utilizan todas las combinaciones posibles de estos exones en el corte y empalme alternativos, el gen *Dscam* puede producir 38.016 proteínas diferentes.

Un ejemplo todavía más extremo es el del gen *para*, que también se expresa en el sistema nervioso de *Drosophila* y que tiene 13 exones alternativos, pero que también experimenta en 11 posiciones diferentes otra forma de modificación

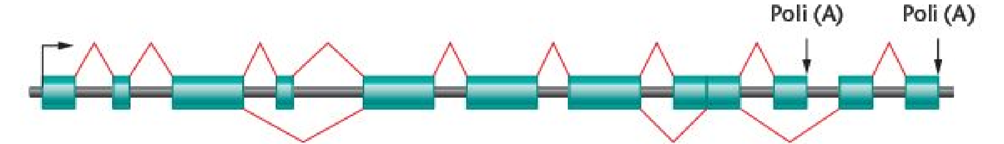


FIGURA 17.21 Patrones de corte y empalme alternativo de un mRNA eucariótico. Los cilindros representan los exones. El patrón normal de procesamiento se muestra encima de los exones; los patrones alternativos de procesamiento se muestran debajo de los exones. Observe que el corte y empalme alternativo puede añadir exones y un nuevo sitio de poliadenilación. A menudo los sitios de procesamiento alternativo se usan en múltiples combinaciones, cuto resultado son muchos mRNAs diferentes a partir de un único transcrito.

[1] *Nota del traductor:* a principios del 2005, la estimación del número de genes en el genoma humano se ha reducido hasta los 20.000 a 24.000 genes por genoma haploide.

(a)

(b)
Células ciliadas internas
Células ciliadas externas
IHC
OHC
OHC
OHC
Membrana basilar

(c)
Células ciliadas internas
Células ciliadas externas
20.000 Hz
Gradiente de frecuencia
20 Hz

(d)
STREX

(e)
Exón STREX

Desactivación rápida
Baja sensibilidad a Ca^{2+}

Desactivación lenta
Alta sensibilidad a Ca^{2+}

FIGURA 17.22 Corte y empalme alternativo en el gen *SLO* humano. (a) Cóclea del oído interno, que contiene la membrana basilar con células ciliadas. (b) Vista de la sección transversal de la membrana basilar, que muestra la monocapa de células internas y las tres capas de células exteriores. (c) Vista de la superficie de la membrana basilar, que muestra la disposición de las células ciliadas y el gradiente de frecuencia sónica que reciben los cilios a lo largo de la membrana. (d) Organización de exones e intrones del gen *SLO*. Los sucesos normales de corte y empalme se muestran encima de los exones; los sitios alternativos se muestran debajo de los exones. Los exones constitutivos se muestran de color plateado, lo exones alternativos en púrpura y el exón STREX en magenta. (e) La presencia o la ausencia del exón STREX afecta la función del canal de potasio sensible a calcio que se encuentra en la membrana plasmática de las células ciliadas internas.

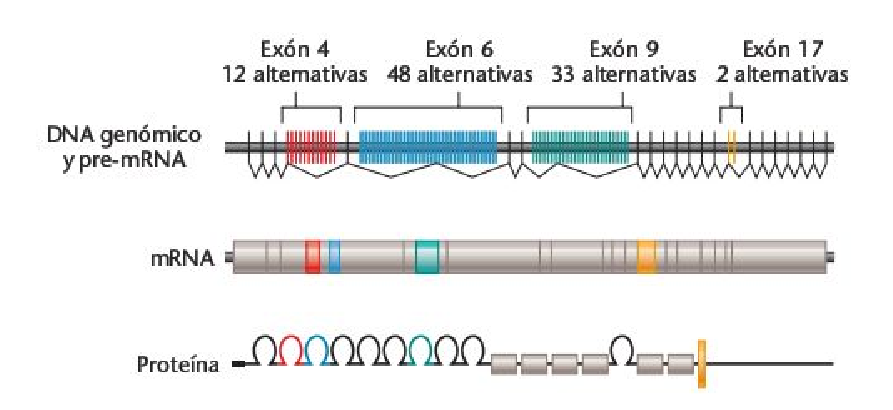


FIGURA 17.23 (Arriba) Organización del gen *Dscam* de *Drosophila melanogaster* y del pre-mRNA transcrito. Cada mRNA contendrá uno de los 12 posibles exones para el exón 4 (en rojo), uno de los 48 exones posibles para el exón 6 (en azul), uno de los 33 exones posibles para el exón 9 (en verde) y uno de los 2 exones posibles para el exón 17 (en amarillo). Si se utilizan todas las combinaciones posibles de estos exones, el gen Dscam podría codificar hasta 38.016 versiones diferentes de la proteína DSCAM.

postrascripcional denominada edición. La edición del RNA implica la sustitución de bases tras la transcripción y el corte y empalme. Si se tiene en cuenta tanto el corte y empalme alternativo como la edición, en teoría el gen *para* puede producir más de un millón de transcritos diferentes.

El genoma de *Drosophila* contiene unos 13.000 genes, pero el gen *Dscam* puede producir, el solo, 2,5 veces más proteínas, y si bien el gen *para* puede ser un ejemplo extremo, debería ser obvio que el proteoma de *Drosophila* es mucho más complejo que su genoma. Puesto que el corte y empalme alternativo es mucho más común en los vertebrados, la combinación de las proteínas que pueden producirse a partir del genoma humano puede ser astronómica.

Silenciamiento del RNA de la expresión génica

En estos últimos años, el descubrimiento de que hay moléculas de RNA que desempeñan una importante función en el control de la expresión génica ha generado un nuevo campo de investigación. Descubiertas inicialmente en plantas, actualmente se sabe que existen moléculas de RNA cortas, de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica en el citoplasma mediante la represión de la traducción de los mRNA y de su degradación. Más recientemente, se ha demostrado que hay también RNAs parecidos que actúan en el núcleo, alterando la estructura de la cromatina y produciendo un **silenciamiento génico**.

La forma mejor estudiada de silenciamiento del RNA se denomina **interferencia del RNA** (**RNAi**) en animales, y silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en plantas[2]. Este proceso empieza con un RNA de doble cadena (de unos 70 nucleótidos de longitud) que es procesado por una proteína (denominada Dicer) que posee actividad RNasa de doble cadena. Dicer tiene dos dominios catalíticos, y funciona como un dímero [Figura 17.24(a)]. Uno de los dominios catalíticos de cada monómero es inactivo, y los dominios activos alinean y cortan este RNA a intervalos de unos 21 nucleótidos [Figura 17.24(b)]. El producto en un RNA corto (de aproximadamente 21 nucleótidos) denominado **RNA de interferencia corto** (**siRNA**, del inglés *small interfering RNA*). El siRNA se desespiraliza en sus cadenas sencillas con sentido y antisentido. La cadena antisentido se combina con un complejo proteico denominado **RISC** (*c*omplejo de *s*ilenciamiento *i*nducido por *R*NA), que reconoce, se une y corta los mRNA que contengan secuencias complementarias a la cadena antisentido del siRNA (Figura 17.25). RISC corta el mRNA cerca de la zona media de la región emparejada con el siRNA, y los fragmentos de RNA se degradan. Los miembros de la familia Argonauta (Argo-1 y Argo-2), que forman parte del complejo RISC, pueden desempañar una función importante en el corte del mRNA.

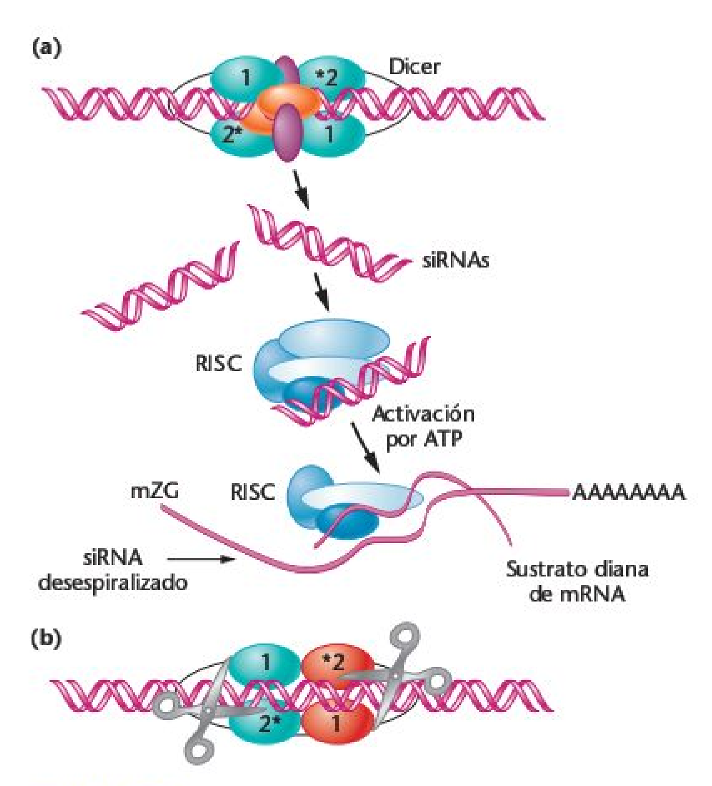


FIGURA 17.24 (a) Acción de Dicer y RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA). Dicer se une a moléculas de RNA de doble cadena y las corta en moléculas de aproximadamente 21 nucleótidos, denominadas RNAs de interferencia cortos (siRNA). Los siRNA se unen al complejo multiproteico RISC y se desespiralizan para formar moléculas de cadena sencilla, cuyo objetivo son los mRNA cuya secuencia sea complementaria, marcándolos para la degradación. (b) Unión al RNA de los dominios catalíticos de los monómeros de Dicer. Los dominios señalados con un asterisco son inactivos. El corte producido por los dominios activos produce fragmentos de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud.

En fenómeno de RNAi desempeña una función importante en la defensa celular contra la invasión de virus y en el silenciamiento de los transposones. Sin embargo, las pruebas preliminares de que se dispone indican que estas secuencias también pueden desempeñar una función durante el desarrollo.

Un segundo tipo de silenciamiento del RNA es mediado por cortas moléculas de RNA denominadas **microRNA** (**miRNA**). Los miRNA proceden de una región de aproximadamente 70 a 130 nucleótidos que forma una horquilla imperfecta que es cortada por Dicer. En las células animales, este producto, un RNA de aproximadamente 19-14 nucleótidos, se empareja con las regiones 3′ no traducidas (UTR) de las moléculas maduras de mRNA bloqueando la traducción (Figura 17.25). En plantas, los miRNA pueden detener la traducción e iniciar la degradación del mRNA.

En *C. elegans* y en los vertebrados, los genes que codifican los miRNA pueden constituir hasta el 0,2-0,5 por ciento del genoma, e incluyen varios cientos de genes. El patrón de expre-

[2] *Nota del traductor:* Este tipo de silenciamiento también se ha encontrado en levaduras, donde recibe el nombre de «represión», aunque se suele utilizar la expresión inglesa *quelling*.

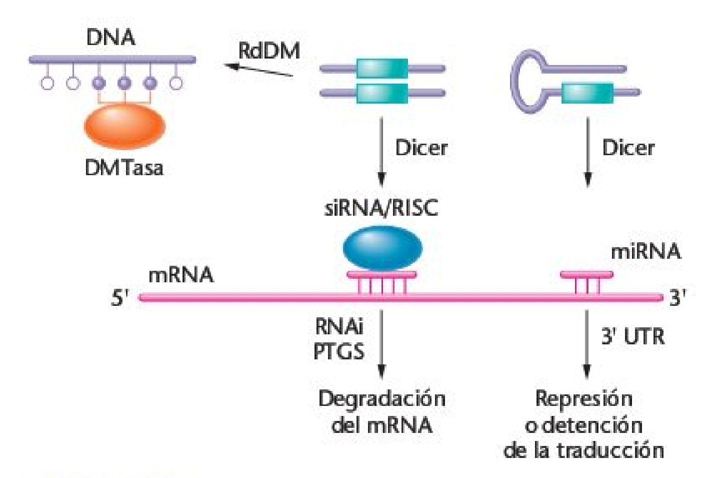


FIGURA 17.25 Mecanismo de regulación génica mediante silenciamiento génico del RNA. En el citoplasma hay dos sistema que operan para silenciar genes. (Centro) En el silenciamiento mediado por siRNA, una molécula precursora de RNA es procesada por Dicer, una proteína con actividad RNasa que forma un RNA antisentido de cadena sencilla que se combina con un complejo proteico con actividad endonucleasa. El siRNA/RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) se une a los mRNA cuya secuencia sea complementaria, y corta estos mRNA en fragmentos que son degradados. Este proceso se denomina RNAi en células animales, y silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en plantas. (Derecha) Un precursor con una doble cadena parcial es procesado por Dicer para generar microRNA (miRNA), que se une a las regiones 3' no traducidas (UTR) complementarias inhibiendo la traducción. En plantas, los miRNA causan la detención de la traducción. (Izquierda) Los RNAs pequeños, procesados por Dicer, desempeñan una función en la metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM). Estos RNA se combinan con las DNA metiltransferasas (DMTasas) para metilar residuos de citosina en las regiones promotoras (círculos púrpura), silenciando los genes.

sión de muchos de los genes de miRNA es congruente con la función de estos RNA en el control del desarrollo. En *Arabidopsis*, muchas de las dianas de los miRNA son factores de trascripción que son importantes en la determinación del destino celular en la planta en desarrollo.

Más recientemente, se ha descubierto que los RNA cortos pueden domiciliarse en regiones específicas del genoma para modificar la cromatina. Los siRNA y los miRNA dependen del reconocimiento de secuencia y de la unión entre moléculas de RNA. Sin embargo, el RNA también puede emparejarse con el DNA, y los RNA cortos están implicados en diversas formas de modificación del genoma que regulan la expresión génica. Entre estas formas se incluye la **metilación del DNA dirigida por RNA** (**RdDM**) de la citosina (Figura 17.25). La RdDM es un proceso muy específico, y se limita a la región de emparejamiento RNA-DNA. En la RdDM, se metilan dinucleótidos CG y otros residuos C de las regiones promotoras, lo que conduce a silenciamiento génico.

Se ha demostrado que las moléculas cortas de RNA regulan la expresión génica mediante dos mecanismos citoplasmáticos (la degradación y la detención o la inhibición de la traducción del mRNA), y en el núcleo mediante la metilación de residuos de citosina del DNA, lo que conduce en todos los casos a un silenciamiento génico. Además, también se han descubierto otros diversos tipos de RNAs cortos endógenos que todavía deben clasificarse, lo que hace que parezca probable que todavía queden por descubrir muchas más clases distintas de RNAs pequeños funcionales, que desempeñen funciones importantes en la regulación de la estructura y la función del genoma.

17.9 El corte y empalme alternativo y la estabilidad del mRNA pueden regular la expresión génica

La demostración de que el corte y empalme alternativo es un fenómeno común y que puede producir muchas proteínas diferentes a partir de un único gen plantea diversas preguntas. Primero, ¿son funcionales todas las variantes proteicas producidas por corte y empalme alternativo? Quizás el corte y empalme alternativo sea un proceso inherentemente poco eficiente, y solo un subgrupo de las variantes de corte y empalme produzca proteínas funcionales. La segunda pregunta relacionada hace referencia a si el corte y empalme es un proceso aleatorio, o está dirigido y regulado de alguna manera. Si el corte y empalme está regulado, quizás entonces sea importante es estadios específicos del ciclo vital o en células con funciones específicas.

Aunque se conocen muchos ejemplos de corte y empalme alternativo, sólo unos pocos muestran de manera concluyente que están regulados y que tienen importancia funcional. El caso mejor conocido es el proceso de determinación del sexo en *Drosophila*, en el que el corte y empalme alternativo de los transcritos de cinco genes coloca al embrión en la ruta de desarrollo de macho o de hembra.

La determinación del sexo en *Drosophila:* un modelo de regulación del corte y empalme alternativo

Como se citó en el Capítulo 7, el sexo en *Drosophila* se determina por la proporción entre cromosomas X y autosomas (X:A). Cuando la proporción es de 0,5 (1X:2A) se producen machos, aunque no haya ningún cromosoma Y; cuando la relación es de 1,0 (2X:2A) se producen hembras. En proporciones intermedias (2X:3A) se producen organismos intersexos. Un pequeño grupo de genes interpreta las proporciones cromosómicas, lo que inicia una cascada de sucesos de desarrollo que resultan en la producción de células somáticas de macho o de hembra y en los correspondientes fenotipos. Los tres genes más importantes de esta ruta son *Sex lethal* (*Sxl*), *transformer* (*tra*) y *doublesex* (*dsx*). Vamos a ver algunos de los pasos clave de este proceso.

El gen regulador que hay al inicio de esta cascada (Figura 17.26) es *sex lethal* (*Sxl*), que codifica una proteína de unión a RNA. La proteína SXL sólo se expresa en los embriones hembra. En presencia de SXL se expresan los patrones de corte y empalme de hembra, y se reprimen los de macho.

Una de las dianas de SXL es el conjunto de transcritos del gen, *transformer* (*tra*). Cuando SXL está presente, los pre-mRNA de *tra* se cortan y empalman para producir una proteína funcional. Si no hay proteína SXL, el corte y empalme de *tra* produce una proteína truncada no funcional. ¿Cómo funciona este proceso? El pre-mRNA de *tra* incluye en codón de terminación en el exón 2. En hembras, SXL se une a este pre-mRNA y el corte y empalme elimina el exón 2 del mRNA. En machos (que no sintetizan la proteína SXL), el corte y empalme incorpora el codón de terminación en el mRNA maduro. En las hembras, la traducción produce una proteína funcional específica de hembra que controla los pasos posteriores de la diferenciación sexual, pero en los machos, el codón de terminación termina la traducción prematuramente, lo que produce un producto génico inactivo.

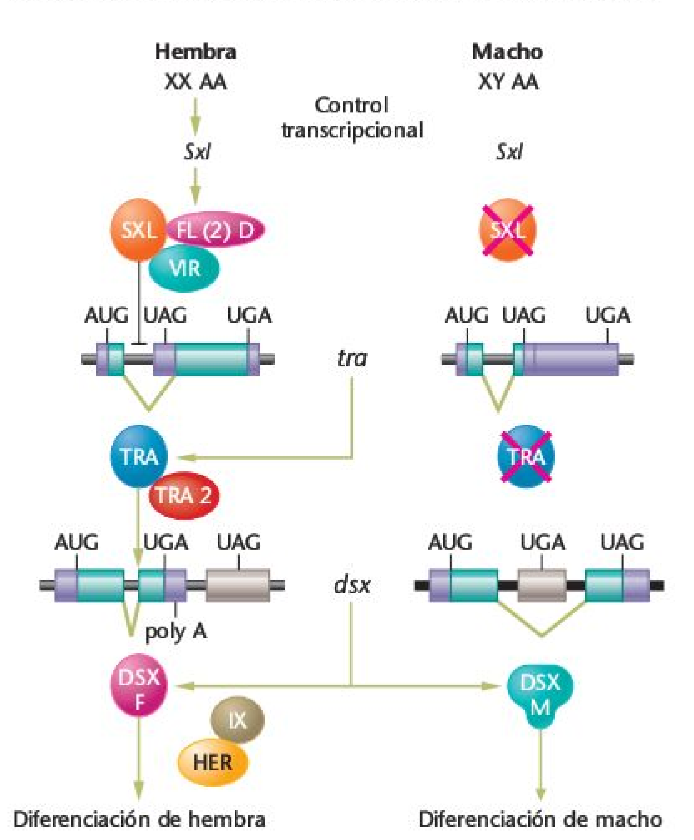


FIGURA 17.26 Jerarquía de la regulación génica en la determinación del sexo en *Drosophila*. En hembras, la proporción X:A activa la transcripción del gen *Sxl*. El producto de este gen se une al pre-mRNA del gen *tra* y dirige su corte y empalme de manera específica de hembra. La proteína TRA específica de hembra, en combinación con la proteína TRA-2, dirige el corte y empalme específico de hembra del pre-mRNA de *dsx*, lo que resulta en una proteína específica de hembra (DSX-F). Esta proteína, en combinación con la proteína IX, suprime la ruta de desarrollo sexual de macho y activa la ruta de hembra. En machos, la proporción X:A no activa el gen *Sxl*. El resultado es un procesamiento especifico de macho del pre-mRNA de *tra*, lo que resulta en una proteína TRA no funcional, lo que a su vez conduce al procesamiento específico de macho de los transcritos de *dsx*, lo que resulta en una proteína específica de macho (DSX-M), que activa la ruta de desarrollo sexual de macho.

El siguiente gen de la cascada, *dsx*, representa un punto de control crítico en el desarrollo del fenotipo sexual. Produce un mRNA y una proteína funcional tanto en hembras como en machos. Sin embargo, el pre-mRNA se procesa de manera específica de sexo produciendo transcritos diferentes. En hembras, la proteína TRA funcional es un factor de corte y empalme que se une pre-mRNA de *dsx*, y dirige su procesamiento de manera específica de hembra. En los machos, que no presentan la proteína TRA, el corte y el procesamiento del pre-mRNA de *dsx* resultan en un mRNA y una proteína específicos de macho. Tanto la proteína DSX de hembra (DSX-F) como la proteína de macho (DSX-M) son factores de transcripción, pero sus efectos son opuestos. DSX-F trabaja coordinadamente con la proteína codificada por el gen *intersex* (*ix*) para reprimir los genes que conducen al desarrollo sexual de macho. DSX-M trabaja de forma independiente de la proteína IX para que se expresen los genes de la ruta de desarrollo de macho y para reprimir los genes de la ruta de hembra.

En resumen, el gen *Sxl* funciona como un interruptor que selecciona la ruta de desarrollo sexual al controlar el corte y empalme del transcrito de *dsx* de modo específico de hembra. La proteína SXL solo se produce en embriones con una proporción X:A de 1. Si falla el control del procesamiento del transcrito de *dsx* en el modo de hembra se produce el corte y empalme defectivo del transcrito en el modo de macho, lo que conduce a la producción del fenotipo masculino.

Control de la estabilidad del mRNA

Después de que los precursores del mRNA se procesen y se transporten, entran en la población de moléculas de mRNA citoplasmáticas, de las que se seleccionan los mensajes para ser traducidos. Todas las moléculas de mRNA tienen un tiempo de vida característico (denominado vida media o $t_{1/2}$); un tiempo después de ser sintetizados se degradan en el citoplasma. La vida media de las diferentes moléculas de mRNA varía ampliamente. Algunas se degradan pocos minutos después de su síntesis, mientras que otras tardan horas e incluso meses y años (en el caso de los mRNA almacenados en oocitos). La estabilidad del mRNA, y por lo tanto su *tasa de reciclado*, es intrínseco a su secuencia. La estabilidad de algunos mRNA puede ser controlada mediante RNAs pequeños endógenos, como se ha descrito anteriormente.

Otra manera de controlar la estabilidad del mRNA es mediante el control del **nivel de traducción**, la traducción del mensajero controla su estabilidad. Uno de los ejemplos mejor estudiados de regulación mediante la traducción es la síntesis

de la α y la β-tubulinas, las subunidades que componen los microtúbulos eucarióticos. Si una célula se trata con la droga colchicina, los microtúbulos se desensamblan rápidamente y se incrementa la concentración de las subunidades α y β. En estas condiciones, la síntesis de α y β-tubulina decae drásticamente. Sin embargo, cuando las células se tratan con vimblastina, una droga que también provoca que los microtúbulos se desensamblen, la síntesis de tubulinas se incrementa. La diferencia entre estas dos drogas es que, además de causar el desensamblaje de los microtúbulos, la vimblastina precipita las subunidades, lo que disminuye la concentración de las subunidades α y β libres. A bajas concentraciones, se estimula la síntesis de las tubulinas, mientras que a altas concentraciones, la síntesis se inhibe. Este tipo de regulación traduccional se denomina **autorregulación**.

La investigación de Don Cleveland y de sus colaboradores ha descrito las condiciones en las que se regula la estabilidad del mRNA de la tubulina (Figura 19.26). La fusión de fragmentos génicos de la tubulina con un gen clonado de la timidina quinasa demuestra que los 13 primeros nucleótidos del extremo 5′ del RNA mensajero localizados a continuación del sitio de inicio de la transcripción (que codifican la región aminoterminal de la proteína) hacen que el mRNA híbrido tubulina-timidina quinasa se regule con la misma eficiencia que el mRNA intacto de la tubulina. Estos primeros 13 nucleótidos codifican los aminoácidos Met-Arg-Glu-Ile (abreviado como MREI). Las deleciones, translocaciones y mutaciones puntuales en este segmento de 13 nucleótidos suprimen la regulación. El análisis de la distribución citoplasmática de los mRNA demuestra que el tratamiento con drogas sólo degrada los mRNA de tubulina que están unidos a ribosomas. Las copias del mRNA de tubulina que no están unidas a ribosomas están protegidas de la degradación. Además, la traducción debe proseguir hasta el codón 41 del mRNA para que se produzca la regulación.

Para explicar estas observaciones se ha propuesto el modelo que se muestra en la Figura 17.27. En este modelo, la regulación se produce después de que el proceso de traducción haya empezado. Los primeros cuatro aminoácidos (MREI) del producto génico de la tubulina (en este caso, de la β-tubulina) constituyen un elemento de reconocimiento al que se unen los factores de regulación. La concentración citoplasmática de las unidades α y β de la tubulina podría tener esta función reguladora. Esta interacción proteína-proteína invoca la acción de una RNasa, que podría ser un componente ribosómico o una RNasa citoplasmática no específica. La acción de esta RNasa degrada el mRNA de la tubulina durante su traducción, parando la biosíntesis de tubulina. Como alternativa, la unión del elemento regulador podría provocar que el ribosoma detuviese su translocación por el mRNA, dejándolo expuesto a la acción de la RNasa. La traducción debe producirse al menos hasta el codón 41 puesto que los primeros 30 a 40 aminoácidos traducidos están en un túnel dentro de la subunidad grande del ribosoma, y sólo la traducción de este número de aminoácidos hace que la secuencia de reconocimiento MREI sea accesible a la unión.

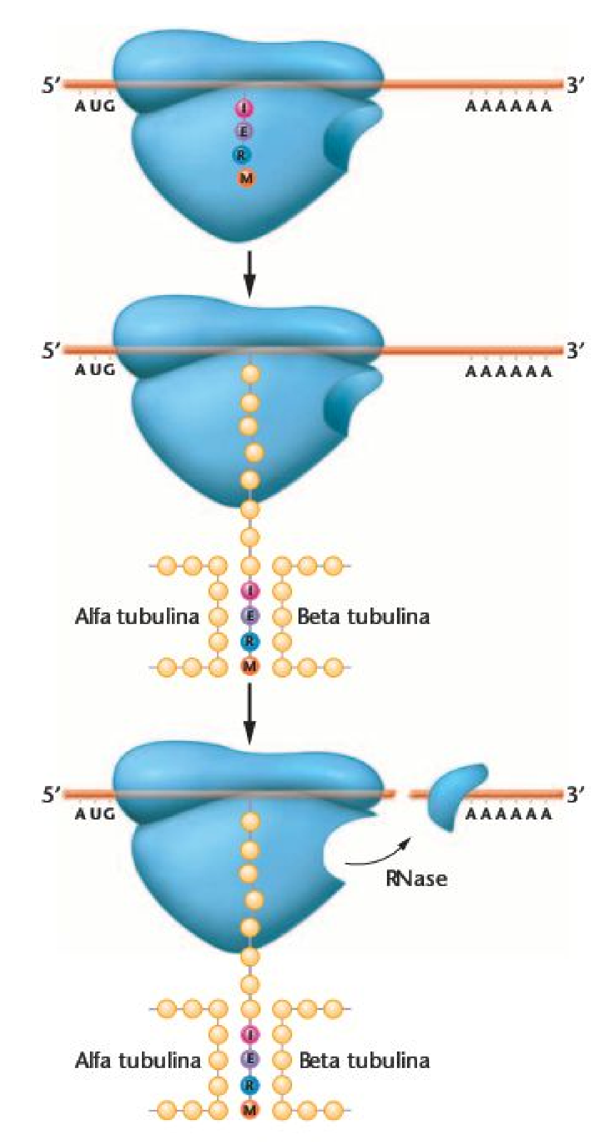


FIGURA 17.27 Modelo de regulación postranscripcional de la síntesis de la tubulina.

Se ha propuesto que esta renovación del mRNA emparejada a su traducción puede ser un mecanismo regulador para otros genes, como los de las histonas, algunos factores de transcripción, las linfoquinas y las citoquinas. Esto sugiere la existencia de un mecanismo regulador que actúa sobre los mRNA durante su traducción, probablemente mediante interacciones proteína-proteína entre un elemento regulador y la cadena polipeptídica naciente, provocando la activación de una RNasa que degrada en mRNA.

¿Cómo lo sabemos?

¿Cómo nos hemos dado cuenta de que la concentración de las subunidades de la tubulina regulan la estabilidad del mRNA de la tubulina?



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Enfermedades genéticas humanas y pérdida de la regulación génica

Cuando pensamos en genes mutantes que causan enfermedades a los humanos, generalmente pensamos en mutaciones que cambian un solo nucleótido en la porción codificante del gen y en la producción de una proteína alterada, como en la anemia falciforme, o en una deleción que elimina un codón, como la mutación *Δ508* que provoca la fibrosis quística. Sin embargo, la expresión génica es un proceso complejo que precisa diversos pasos secuenciales y la acción de grandes complejos multiproteicos.

A medida que se aprenden más cosas sobre el proceso de regulación génica y sobre los mecanismos moleculares de las enfermedades genéticas humanas, se hace evidente que mutaciones que afecten a cualquier paso del proceso de regulación génica pueden ocasionar una enfermedad genética.

Uno de los primeros pasos en la expresión génica en los eucariotas implica la remodelación de la cromatina para hacerla accesible a la transcripción. Esta remodelación implica la acción del complejo proteico SWI/SNF dependiente de ATP. Mutaciones en los genes que codifican las enzimas del complejo SWI/SNF provocan enfermedades con una amplia gama de fenotipos. Entre estas enfermedades se puede citar el síndrome de Williams, una enfermedad autosómica dominante que causa defectos cardíacos y pulmonares, alfa-talasémia y retraso mental ligado al cromosoma X. El gen afectado codifica el factor de cotranscripción Daxx, que dirige la remodelación de la cromatina hacia promotores específicos, y puede actuar provocando la metilación aberrante de secuencias de DNA repetitivas.

La acetilación de las histonas y otras modificaciones también son pasos importantes para la regulación de la expresión génica. Las histona acetiltransferasas (HAT) y las histona desacetilasas (HDAC) cooperan con los factores SWI/SNF para remodelar la cromatina como primer paso de la transcripción. Una mutación en un gen que codifica una histona acetilasa (*CREBBP, proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP, también denominada proteína de unión a CREB*) es responsable del síndrome de Rubisntein-Taybi, una enfermedad autosómica dominante que provoca un retraso en el crecimiento, anomalías faciales y en las manos y retraso mental. En general, la inactivación de histona acetilasas o desacetilasasas provoca enfermedades que afectan al desarrollo con una amplia gama de fenotipos. La activación anormal de de HATs o de HDACs se asocia a diversos tipos de cáncer.

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer disease*) es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que afecta a personas de edad avanzada, con más de 4'5 millones de afectados sólo en los EEUU, un número que se espera que se triplique durante los próximos 20 años. Las personas afectadas sufren una pérdida gradual de la memoria y del juicio, de la capacidad de relación social y cambios de personalidad, y provoca su muerte a los 8-10 años después de la aparición. El cerebro de los afectados de AD presentan una lesiones características causadas por la acumulación de depósitos extracelulares de un polipéptido incorrectamente procesado denominado proteína β-amiloide. Un 25 por ciento de los casos presenta un componente genético. Uno de estos casos, la AD familiar de tipo 3, es una forma agresiva, de rápida progresión y de temprana aparición causada por una mutación en el gen *Presinilina 1* (*PS1*). La proteína PS1 tiene diversas funciones; controla la tasa de producción de la proteína β-amiloide y la expresión de diversos genes. La forma mutante causa una producción excesiva de la proteína amiloide y la sobre-expresión de genes que incrementan la tasa de neurodegeneración, sucesos que aceleran la progresión de la AD de tipo 3.

Otras enfermedades son el resultado de la desrepresión de la transcripción, en lugar de ser debidas a anomalías en la iniciación de la transcripción. La distrofia facioscapulohumeral (FSHD) es una enfermedad autosómica dominante que provoca el debilitamiento progresivo de los músculos de los hombros, el abdomen y la pelvis. No hay ningún gen mutante que provoque la FSHD. En cambio, esta enfermedad es causada por la alteración de la organización del genoma en el extremo del brazo largo del cromosoma 4, la región denominada 4q35. En condiciones normales, un conjunto de secuencias repetitivas denominadas repeticiones D4Z4, reprime la transcripción de los genes de 4q35 formando un complejo multiproteico de unión a DNA. En las personas con FSHD, la mayoría, si no todas las repeticiones D4Z4, están delecionadas. Esta deleción elimina la represión de los genes de 4q35, y su expresión causa la FSHD.

Con todo lo que se sabe sobre los mecanismos moleculares de las enfermedades genéticas de los humanos, se hace cada vez más evidente que mutaciones en los genes asociados a la remodelación de la cromatina y a la expresión génica resultan en complejos fenotipos multisistema. Trabajos realizados en organismos modelo están revelando cómo contribuyen los factores genéticos y epigenéticos a los fenotipos de las enfermedades complejas, lo que, junto con la información proporcionada por el Proyecto Genoma Humano, nos está haciendo entrar en una nueva y excitante era en la investigación en genética humana.

Referencias

Cho, K.S., Elizondo, L.I., and Boerkoel, C.F. 2004. Advances in chromatin remodeling and human disease. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 14:308-315.

Gabellini, D., Green, M.R., and Tupler, R. 2004. When enough is enough: genetic diseases associated with transcriptional derepression. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 14:301-307.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Los mecanismos que controlan la regulación génica en eucariotas están dirigidos por las propiedades del tamaño expandido del genoma, la separación espacial y temporal entre la transcripción y la traducción y, en muchos organismos, por su pluricelularidad.
2. Las funciones desempeñadas por la estructura de la cromatina, los factores de transcripción y la transducción de señales, así como también por la expresión de conjuntos específicos de genes se estudian como modelos de regulación génica en los organismos superiores.
3. La transcripción en eucariotas está controlada por la interacción entre los promotores y los intensificadores. Otras secuencias reguladoras, como la caja CCAAT, son elementos de las regiones promotoras que se encuentran cerca del promotor. Los elementos intensificadores, que controlan el grado de transcripción, pueden localizarse antes, después o dentro del gen que se expresa.
4. Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias de reconocimiento del DNA situadas dentro de los promotores y de los intensificadores, y activan la transcripción mediante interacciones proteína-proteína.
5. Un gen puede tener diferentes patrones de metilación en diversos tejidos, que a menudo están relacionados con diferentes patrones de regulación.
6. En eucariotas hay varios tipos posibles de control postranscripcional de la expresión génica. Uno de estos mecanismos es el procesamiento alternativo de un solo tipo de pre-mRNA para generar diferentes tipos de mRNA. Otro mecanismo, dirigido por los RNA pequeños, funciona en el núcleo y en el citoplasma para regular la expresión génica.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Los sitios reguladores de los genes eucarióticos acostumbran a estar localizados dentro de un intervalo de unos pocos centenares de nucleótidos del sitio de inicio de transcripción, pero pueden estar localizados a varias kilobases de este sitio. Las pruebas de unión a secuencias específicas de DNA se han utilizado para detectar y aislar factores proteicos presentes en bajas concentraciones en extractos nucleares. En estos experimentos, las secuencias de unión del DNA se unen al material de una columna, y se pasan extractos nucleares por ésta. La idea es que si hay proteínas que se unen específicamente a la secuencia representada en la columna, éstas se unirán al DNA y podrán recuperarse de la columna después de haber lavado todo el material no unido. Una vez se ha identificado y aislado una proteína de unión a DNA, el problema es diseñar un método general para rastrear bibliotecas para encontrar genes que codifiquen éstos y otros factores de unión a DNA. La determinación de la secuencia aminoacídica de la proteína y la construcción de sondas de oligonucleótidos sintéticos requiere mucho tiempo y permite rastrear un solo factor cada vez. Basándose en la gran afinidad de unión entre la proteína y la secuencia de reconocimiento del DNA, ¿cómo rastrearía una biblioteca para encontrar factores de unión?

Solución: Se han desarrollado varias estrategias generales, siendo una de las más prometedoras la diseñada en el laboratorio de Steve McKnigth, del Fred Hutchinson Cancer Center. Se clona cDNA aislado de células que expresan el factor de unión en el vector lambda gt11. Se absorben calvas de esta biblioteca, que contienen proteínas provenientes de la expresión de los insertos de cDNA, en filtros de nitrocelulosa, y se rastrean con una sonda de DNA de doble cadena radioactiva correspondiente al sitio de unión. Si hay una proteína de fusión correspondiente al factor de unión, la sonda de DNA se unirá a ella. Después de lavar la sonda no unida, el filtro se somete a autorradiografía, identificándose las calvas correspondientes a las señales de unión a DNA. Una ventaja adicional de esta estrategia es que se puede reciclar el filtro de nitrocelulosa lavando el DNA unido. Este procedimiento ingenioso es parecido a los procedimientos de hibridación de colonias y de calvas utilizados en el rastreo de bibliotecas y descritos en el Capítulo 18, y proporciona un método general para aislar genes que codifican factores de unión a DNA.

2. En teoría, la compartimentación del contenido de las células eucariotas proporciona una oportunidad para la regulación génica. La atención se centra en la importación y la exportación de proteínas y ácidos nucleicos a través de los poros nucleares. En apariencia, estas mercancías moleculares son transportadas principalmente por dos clases de proteínas, la importina y la exportina, y también por otras proteínas. (Macara, I. 2000. *Microbiol. and Mol. Evol. Rev.* 65:570-94.) Sugiera una función para estas proteínas de transporte en la regulación génica de los eucariotas.

Solución: Si los mecanismos de transporte nucleocitoplasmáticos pueden reconocer diferentes especies de RNA y negarles el paso, facilitárselo y redirigirlas a otros sitios, entonces pueden contribuir a la regulación postranscripcional. Por ejemplo, incluso si dos células diferentes generan una concentración parecida de un RNA determinado, el tratamiento diferencial que le otorgue la maquinaria de transporte ejercerá una regulación. Además, si determinadas moléculas activadoras o represoras de un gen se importan o se exportan selectivamente del núcleo, el resultado final podría ser una actividad génica diferencial. Si existiese este transporte selectivo, entonces los eucariotas tendrían un nivel adicional de regulación genética disponible.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

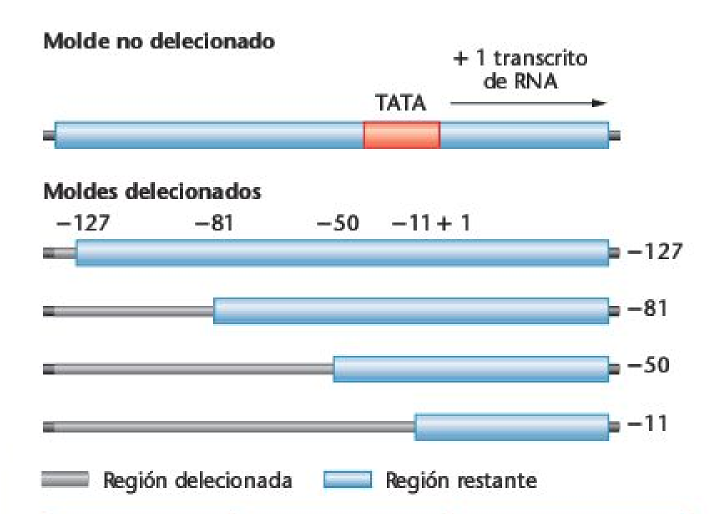
1. ¿Por qué se supone que la regulación génica en eucariotas pluricelulares debe ser más compleja que en procariotas? ¿Por qué es más difícil estudiar este fenómeno en eucariotas?
2. Enumere y defina los niveles de regulación génica expuestos en este capítulo.
3. Compare los elementos reguladores denominados promotores y los denominados intensificadores.
4. La unión de un factor de transcripción a su secuencia de reconocimiento del DNA, ¿es necesaria y suficiente para iniciar la transcripción de un gen regulado? ¿Qué otras moléculas desempeñan también funciones en este proceso?
5. Compare los factores de transcripción designados como activadores verdaderos de con los designados como antirrepresores.
6. Contraste y compare la regulación de los genes *gal* en levadura con los genes *lac* en E. coli.
7. Escriba un ensayo comparando el control de la regulación génica en eucariotas y en procariotas a nivel del inicio de la transcripción. ¿Cómo funcionan los mecanismos de regulación? ¿Cuáles son las semejanzas y las diferencias entre los componentes específicos de los mecanismos de regulación en estos dos tipos de organismos? Relacione las diferencias y las semejanzas con el contexto biológico del control de la expresión génica.
8. Se han propuesto dos modelos para explicar los mecanismos de autorregulación de la síntesis de tubulina: (1) que las subunidades de la tubulina se unan al mRNA, y (2) que las subunidades interaccionen con los polipéptidos de tubulina nacientes. Para distinguir entre estos dos modelos, Cleveland y sus colaboradores introdujeron mutaciones en el elemento regulador de 13 bases del gen de la β-tubulina. Algunas de las mutaciones resultaron en sustituciones aminoacídicas mientras que otras no. Además, cambiaron la fase de lectura de la secuencia de 13 bases intacta. A continuación se muestran los resultados del análisis mutagénico del mRNA.

	met	arg	glu	lys	*Autoregulación*
Silvestre	AUG	AGG	GAA	ATC	+
Mutaciones en el segundo codón	______	UGG	______	______	–
	______	GGG	______	______	–
	______	CGG	______	______	+
	______	AGA	______	______	+
	______	AGC	______	______	–
Mutaciones en el tercer codón	______	______	GAC	______	+
	______	______	AAC	______	–
	______	______	UAU	______	–
	______	______	UAC	______	–

¿Cuál de los dos modelos apoyan estos resultados? ¿Qué experimentos haría para confirmarlo?

9. Está interesado en analizar los factores de transcripción, para lo que ha desarrollado un sistema de transcripción *in vitro* utilizando un fragmento concreto de DNA que se transcribe bajo control de un promotor eucariótico. La transcripción de este DNA se produce cuando añade RNA polimerasa II purificada, TFIID (el factor de unión a TATA), TFIIB y TFIIE (que se unen a la RNA polimerasa). Realiza una serie de experimentos para comparar la eficiencia de transcripción en este «sistema definido» con la eficiencia de transcripción en un extracto nuclear no purificado. Prueba los dos sistemas con su DNA molde y con varios moldes delecionados que ha generado. A continuación se muestran los resultados de su investigación.

   (a) ¿Por qué no se produce transcripción en el molde con la deleción -11?
   (b) ¿En qué difieren los resultados de la prueba con extracto nuclear y los de la prueba con el sistema definido respecto al molde *sin deleción*? ¿Cómo interpretaría estos resultados?
   (c) Para los diferentes moldes delecionados, compare los resultados procedentes del extracto nuclear y del sistema purificado. ¿Cómo interpretaría los resultados de los moldes delecionados? Especifique claramente sus conclusiones basadas en estos datos.



DNA añadido	Extracto nuclear	Sistema purificado
No delecionado	++++	+
deleción −127	++++	+
deleción −81	++++	+
deleción −50	+	+
deleción −11	o	o

\+ Baja eficiencia de transcripción
++++ Alta eficiencia de transcripción
o No se transcribe

10. Si bien es costumbre considerar la regulación transcripcional en eucariotas como el resultado de una influencia positiva o negativa ejercida por la unión al DNA de diferentes factores, se ha descubierto que la realidad es más compleja. Por ejemplo, Ducret y sus colaboradores (1999. *Mol. and Cell. Biol.* 19:7076-87) describieron la acción de un regulador transcripcional (Net) que es

regulado mediante exportación nuclear. En condiciones neutras, Net inhibe la transcripción de genes diana; sin embargo, cuando está fosforilado, Net estimula la transcripción de los genes diana. Cuando la células se encuentra en condiciones de estrés (como luz ultravioleta o choques térmicos) Net se excluye del núcleo, y los genes diana se transcriben. Diseñe un modelo que incluya esquemas que proporcione una explicación congruente de estas tres condiciones.

11. Dado que el corte y empalme alternativo puede conducir a diferentes poblaciones de RNA a partir de un único transcrito primario, ha habido un interés considerable con respecto al transporte nuclear selectivo de RNAs como una forma de regulación genética en eucariotas. El descubrimiento de lo que parece ser una colección de elementos nucleares fibrosos se ha añadido a este interés. Pederson (2000. *Molecular Biology of the Cell* 11:799-805) revisa la bibliografía desde finales de la década de 1990, en la que describen diversos experimentos de marcaje diseñados a determinar si la regulación génica en los eucariotas está relacionada a la clasificación nuclear de los pre-mRNAs. La inmensa mayoría de los resultados indican que los RNA nucleares con cola de poli-A se mueven por difusión. ¿Qué influencia tendrían estos resultados en los modelos que relacionan la regulación génica con el transporte nuclear del RNA?

12. En los eucariotas, las secuencias de DNA no codificante se consideran más por lo que no tienen (promotores, exones, genes, terminadores) que por las posibles funciones que podrían tener. Sin embargo, es posible que el DNA no codificante esté implicado en la regulación génica específica de célula, generando patrones particulares de plegamiento de la cromatina que abran o encierren determinadas regiones genéticas a la transcripción. ¿Qué debilidad inherente tiene esta sugerencia, y cómo esta debilidad se puede aplicar a otros modelos de regulación sugeridos en los eucariotas?

13. El superenrollamiento del DNA se produce cuando delante de la horquilla de replicación se genera una tensión de enrollamiento, donde es aliviada por la DNA girasa. El superenrollamiento también puede estar implicado en la regulación genética. Liu y sus colaboradores (2001. *Proc. Natl. Acad. Sci [USA]* 98:14.883-88) descubrieron que los intensificadores de la transcripción que operan a grandes distancias (2500 pares de bases) dependen del superenrollamiento del DNA, mientras que los intensificadores que operan a cortas distancias (110 pares de bases) no son tan dependientes de ello. Utilizando un esquema, sugiera de qué manera el superenrollamiento puede influenciar positivamente la actividad de un intensificador que actúe a largas distancias.

14. Generalmente la metilación del DNA se asocia a una reducción de la transcripción. Irvine y sus colaboradores (2002. *Mol. and Cell. Biol.* 22:6689-96) estudiaron el impacto de la localización de la metilación del DNA en relación a la actividad génica en células humanas. Los datos que se muestran a continuación describen la expresión relativa de un gen reportero (luciferasa) respecto a la variación de la metilación del DNA fuera y dentro de la región de transcripción. ¿Qué conclusiones generales se pueden extraer de estos datos?

Segmento de DNA	Tamaño de la zona de metilación (en kb)	Número de CpGs metilados	Expresión relativa de la luciferasa
Fuera de la unidad de transcripción (a 0-7,6 kb de distancia)	0,0	0	490X
	2,0	100	290X
	3,1	102	250X
	12,1	593	2X
Dentro de la unidad de transcripción	0.0	0	490X
	1,9	108	80X
	2,4	134	5X
	12,1	593	2X

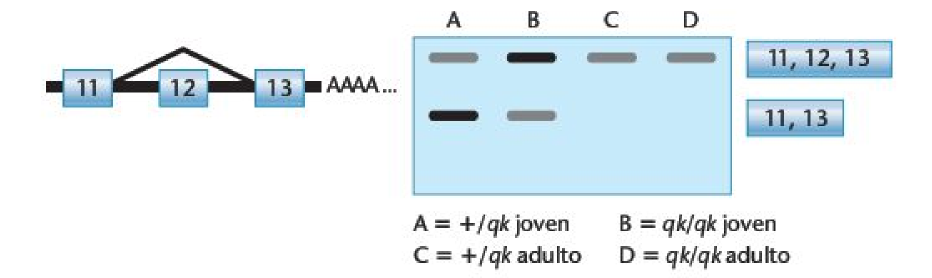
15. En algunos organismos, hay una relación inversa entre la presencia de 5-metilcitosina (m^5C) en secuencias CpG y la actividad génica. Además, m^5C puede estar implicada en el reclutamiento de proteínas que reprimen la cromatina, segregando el genoma en regiones transcripcionalmente activan y no activas. En general, el DNA genómico es relativamente pobre en secuencias CpG debido a la acumulación de m^5C en comparación con las transiciones de timidina; sin embargo, a menudo hay islas de CpG no metilado asociado a genes. Oakes y sus colaboradores (2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 100:1775-80) han determinado que en ratas los patrones de metilación del DNA de los espermatozoides varían con la edad, y sugieren que estas alteraciones relacionadas con la edad respecto a la metilación del DNA pueden ser un mecanismo subyacente a las anomalías relacionadas a la edad en los mamíferos. Considere esta información y proporcione una explicación que relacione las alteraciones de metilación del DNA relacionadas con la edad y las anomalías de nacimiento.

16. La secuenciación del genoma ha proporcionado una oportunidad para examinar similitudes de largo alcance entre diversos organismos, y permite estimar la frecuencia de las homologías génicas. La comparación del genoma de ratón y del humano indican que menos del 1 por ciento de los genes de ratón no tienen un homólogo aparente en el genoma humano, lo que indica una considerable similitud de secuencia. Pero hay otro tema que aparece en términos de la expresión de estos genomas. ¿También se conservan los patrones de corte y empalme alternativo? Thanaraj, Clark y Muilu (2003. *Nucl. Acids Res.* 31:2544-52) determinaron que aproximadamente el 68 por ciento de los patrones de corte y empalme alternativo en los humanos se conserva en ratón. ¿Qué criterio se debería usar para llegar a este porcentaje?




Problemas extra-picantes

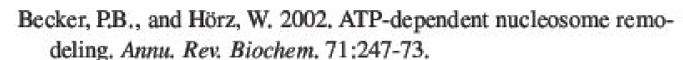
17. Los temblores en los ratones son causados por una mutación recesiva de desmielinización (*qk*), que parece estar implicada en defectos en el corte y empalme alternativo de una proteína de transducción de señales evolutivamente conservada. Los homocigotos (*qk/qk*) padecen temblores cuando realizan esfuerzos. Los ratones adultos pueden experimentar ataques y permanecer inmóviles durante varios segundos. A continuación se muestra una figura que describe los patrones de corte y empalme en diversos genotipos de ratones con temblores y normales. Se representan segmentos del RNA cerebral (que incluyen los exones 11, 12 y 13) del RNA de MAG (glicoproteína asociada a mielina) de ratones jóvenes (14 días) y adultos (2 meses). En el esquema del gel se indica la concentración relativa de cada RNA. (Figura modificada de Wu, J. y colaboradores. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci* 99:4233-38.) Con esta información, describa los patrones de corte y empalme alternativo con respecto a los exones incluidos y excluidos en función de la edad y del genotipo.



18. Se ha estimado que aproximadamente la mitad de los genes humanos producen isoformas de mRNA por corte y empalme alternativo. En algunos casos, RNAs que se han cortado y empalmado de forma incorrecta provocan patologías. Xu y Lee (2003. *Nucl. Acid. Res.* 31:5635-43) examinaron cambios de corte y empalme específicos en cánceres humanos, y encontraron que muchos de los cambios alteran la función de supresión de tumores. En general, ¿qué tipos de RNAs se esperaría cuando hay una pérdida en la especificidad de corte y empalme? ¿Cómo puede asociarse al cáncer esta pérdida de especificidad?

19. Philips y Cooper (2000. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:235-49) han estimado que aproximadamente el 15 por ciento de las mutaciones que causan enfermedades implican errores en el corte y empalme alternativo. Sin embargo, hay un caso interesante en que la deleción de un exón parece ser un fenómeno que incrementa la producción de distrofina en las células musculares de los pacientes de DMD (distrofia muscular de Duchenne). Resulta que la deleción del exón 45 es la mutación más frecuente que causa DMD. Pero algunas personas con distrofia muscular de Becker (BMD), una forma menos severa de distrofia muscular, presenten una deleción de los exones 45 y 46, una condición que van Deutekom y van Ommen (2003. *Nat. Rev. Genetics* 4:774-83) confirmaron experimentalmente. Dado que a menudo las deleciones causan mutaciones de cambio de fase de lectura, proporcione una explicación posible del incremento de producción de distrofina en presencia de la deleción de los exones 45 y 46 en pacientes de BMD.

LECTURAS SELECCIONADAS



Becker, P.B., and Hörz, W. 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71:247-73.

Black, D.L. 2000. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and postgenomic biology. *Cell* 103:367-70.

______. 2003. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72:291-336.

Butler, J.E.F., and Kadonaga, J.T. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16:2583-92.

Dillon, N., and Sabbattini, P. 2000. Functional gene expression domains: Defining the functional unit of eukaryotic gene regulation. *Bioessays* 22:657-65.

Graveley, B.R. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 17:100-107.

Gregory, P.D., Wagner, K., and Hürz, W. 2001. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp. Cell Res.* 265:195-202.

Jackson, D.A. 2003. The anatomy of transcription sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:311-17.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-80.

Lee, T.I., and Young, R.A. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Ann. Rev. Genet.* 34:77-137.

Lusser, A., and Kadonaga, J.T. 2003. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays* 25:1192-1200.

Mahy, N.L., Perry, P.E., Gilchrist, S., Baldock, R.A., and Bickmore, W.A. 2002. Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J. Cell Biol.* 157:579-89.

Meister, G., and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-standard RNA. *Nature* 431:343-349.

Mello, C. C., and Conte, D., Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338-342.

Peterson, C.L., and Logie, C. 2000. Recruitment of chromatin-remodeling machines. *J. Cell. Biochem.* 78:179-185.

Spector, D. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72:573-608.

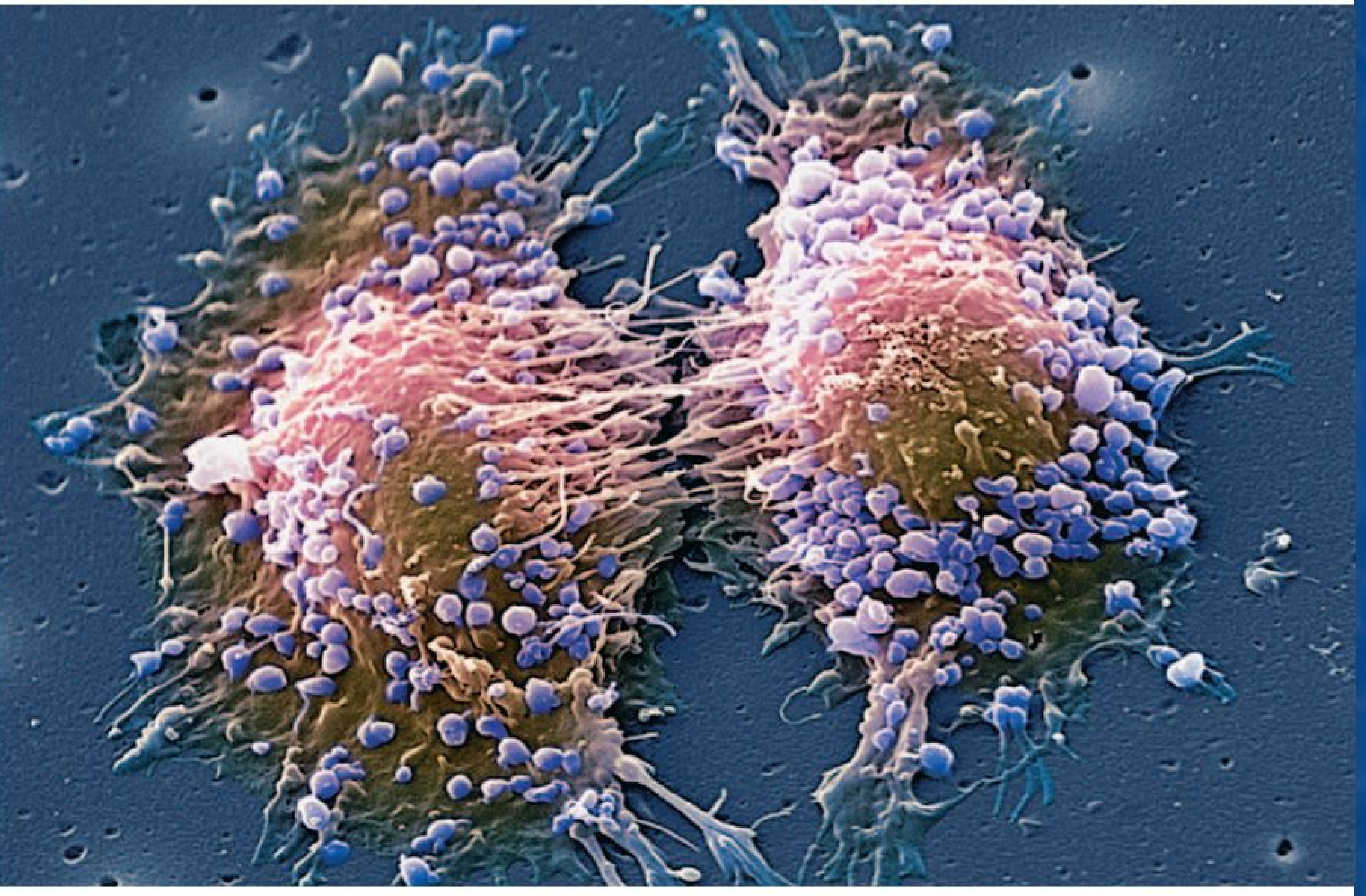
Sudarsanam, P., and Winston, F. 2000. The SWI/SNF family of nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends in Genet.* 16:345-51.

Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22:836-45.

Vershure, P.J., van der Kraan, I., Enserink, J.M., Moné, M.J., Manders, E.M.M., and van Driel, R. 2002. Large-scale chromatin organization and the localization of proteins involved in gene expression in human cells. *The J. of Histochem. Cytochem.* 50:1303-10.

Capítulo Dieciocho

Regulación del ciclo celular y cáncer



Micrografía electrónica de rastreo coloreada de dos células de cáncer de próstata en los estadios finales de división celular (citocinesis). Las células todavía están unidas por bandas de citoplasma.

Conceptos del capítulo

- El cáncer es un grupo de enfermedades genéticas que afectan fundamentalmente aspectos de la función celular, como la reparación del DNA, el ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación y los contactos célula-célula.
- La mayor parte de las mutaciones que causan cáncer se producen en las células somáticas; sólo aproximadamente el 1 por ciento de cánceres tiene un componente hereditario.
- Las mutaciones en los genes relacionados al cáncer conducen a una proliferación anormal y a la pérdida del control de cómo las células se propagan e invaden los tejidos adyacentes.
- El desarrollo del cáncer es un proceso con múltiples pasos que requiere mutaciones en genes que controlan muchos aspectos de la proliferación celular y la metástasis.
- Las células cancerosas muestran un alto nivel de inestabilidad genómica, lo que conduce a la acumulación de múltiples mutaciones en genes relacionados con el cáncer.
- Las mutaciones en protooncogenes y en genes supresores de tumores contribuyen al desarrollo de cánceres.
- Los virus oncogénicos introducen oncogenes en las células infectadas y estimulan la proliferación celular.
- Hay agentes ambientales que contribuyen al cáncer dañando el DNA.

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países occidentales, sólo superada por las afecciones cardíacas. Afecta a personas de todas las edades, y una de cada tres experimentará un diagnóstico de cáncer alguna vez durante su vida. Cada año se diagnostican más de un millón de casos de cáncer en los EEUU, y más de 500.000 personas mueren de esta enfermedad (Tabla 18.1). El cáncer de pulmón es el que más muertes provoca, seguido del de mama, próstata y colon.

Dada su capacidad de causar un inmenso sufrimiento a los humanos, nuestra sociedad ha dedicado importantes recursos a entender las causas del cáncer y a desarrollar tratamientos efectivos. Durante los últimos 30 años, los científicos han descubierto que el cáncer es una enfermedad genética que se caracteriza por la interacción recíproca de oncogenes y de genes supresores de tumores, y que conduce a un crecimiento incontrolado de las células cancerosas y a su propagación. Además, la terminación del Proyecto Genoma Humano ha abierto la puerta a abundante información nueva sobre las mutaciones que empujan a una célula a convertirse en cancerosa. Algunos científicos predicen que en los próximos 25 años las terapias génicas reemplazarán a las quimioterapias.

El objetivo de este capítulo es destacar los conocimientos actuales sobre la naturaleza y las causas del cáncer. Como veremos, el cáncer es una enfermedad genética que surge a partir de mutaciones en genes que controlan muchos aspectos básicos de las funciones celulares. Examinaremos la relación existente entre los genes y el cáncer, y consideraremos que funciones desempeñan las mutaciones, los cambios cromosómicos y los agentes ambientales en el desarrollo del cáncer.

18.1 El cáncer es una enfermedad genética

El logro más importante para entender las causas del cáncer ha sido, quizás, el hecho de darse cuenta de que el cáncer es una enfermedad genética. Las alteraciones genómicas que se asocian al cáncer van desde la substitución de un único nucleótido hasta grandes reorganizaciones cromosómicas, amplificaciones y deleciones (Figura 18.1). Si embargo, a diferencia de otras enfermedades genéticas, el cáncer es causado por mutaciones que se producen predominantemente en células somáticas. Aproximadamente solo el 1 por ciento de los cánceres se asocian a mutaciones en la línea germinal que incrementan la susceptibilidad de la persona a determinados tipos de cáncer. Otra diferencia importante entre el cáncer y otras enfermedades genéticas es que el cáncer no suele surgir como consecuencia de una única mutación, sino de la acumulación de muchas mutaciones, hasta 6 a 10 mutaciones. Las mutaciones que conducen al cáncer afectan a múltiples funciones celulares, que incluyen la reparación de los daños del DNA, la división celular, la apoptosis, la diferenciación celular y los contactos célula-célula.

¿Qué es el cáncer?

Clínicamente, el cáncer se define como un gran número de enfermedades complejas, hasta cien, que se comportan de manera diferente según los tipos celulares en los que se origina. Los cánceres varían en la edad de aparición, la tasa de crecimiento, su capacidad invasiva, la prognosis y la respuesta a los tratamientos. Sin embargo, a nivel molecular todos los cánceres muestran unas características comunes que los agrupan en una familia.

Todas las células cancerosas comparten dos propiedades fundamentales: (1) un crecimiento y división anormales (**proliferación celular**), y (2) anormalidades en las restricciones normales que evitan que las células se propaguen e invadan otras partes del cuerpo (**metástasis**). En las células normales, estas funciones están fuertemente controladas por genes que se expresan en el momento y en el lugar adecuados. En las células cancerosas, estos genes están mutados o se expresan de manera inadecuada.

Esta combinación de proliferación celular incontrolada y de propagación metastática es la que hace que las células cancerosas sean tan peligrosas. Cuando una única célula pierde el

TABLA 18.1 PROBABILIDAD DE CÁNCER EN LOS ESTADOS UNIDOS

			Edad		
Sitio del cáncer	Sexo	Desde el nacimiento hasta los 39 años	40–59 años	60–79 años	Desde el nacimiento hasta la muerte
Todos los sitios	Macho	1 en 62	1 en 12	1 en 3	1 en 2
	Hembra	1 en 52	1 en 11	1 en 4	1 en 3
Mamas	Hembra	1 en 235	1 en 25	1 en 15	1 en 8
Próstata	Macho	< 1 en 10.000	1 en 53	1 en 7	1 en 6
Pulmón, bronquios	Macho	1 en 3.300	1 en 92	1 en 17	1 en 13
	Hembra	1 en 3.180	1 en 120	1 en 25	1 en 17
Colon, recto	Macho	1 en 1.500	1 en 124	1 en 29	1 en 18
	Hembra	1 en 1.900	1 en 149	1 en 33	1 en 18

Fuente: American Cancer Society.

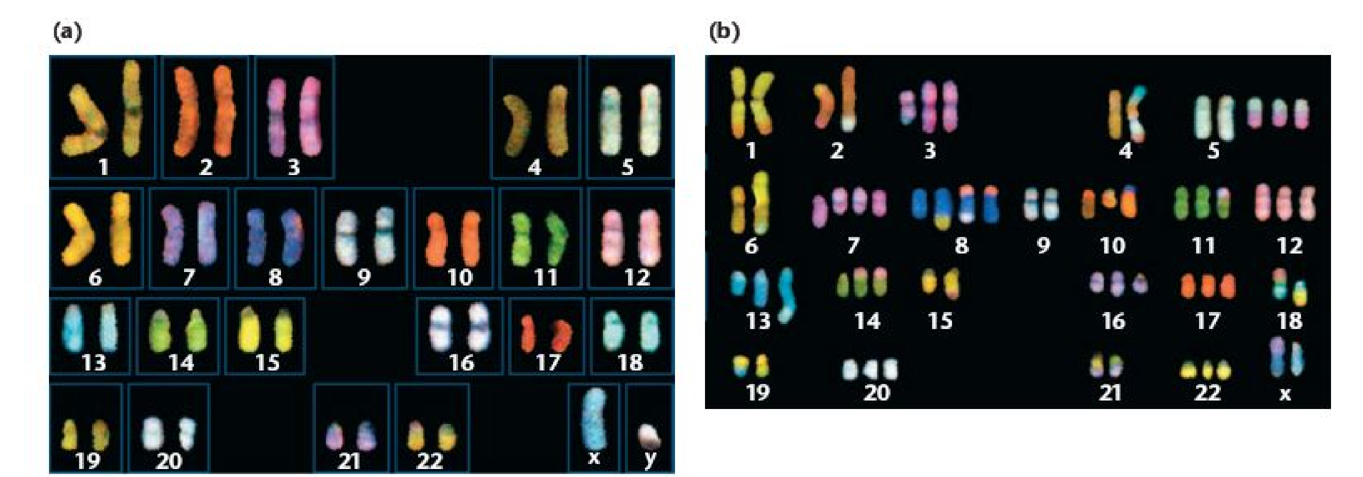


FIGURA 18.1 (a) Cariotipo espectral de una célula normal. (b) Cariotipo de una célula cancerosa que muestra translocaciones, delecciones y aneuploidías, rasgos característicos de las células cancerosas.

control de su crecimiento, puede crecer hasta formar una masa multicelular, un **tumor benigno**. A menudo, los tumores de este tipo se pueden eliminar quirúrgicamente, y generalmente no causan un daño grave. Sin embargo, si las células del tumor también adquieren la capacidad de perder la cohesión, entran en el torrente sanguíneo, invaden otros tejidos y forman tumores secundarios (metástasis), convirtiéndose en malignos. Los **tumores malignos** son difíciles de tratar, y pueden poner en peligro la vida de la persona afectada. Como se verá posteriormente en este capítulo, hay muchos pasos y mutaciones genéticas que convierten un tumor benigno en un tumor maligno peligroso.

Origen clonal de las células cancerosas

Aunque los tumores benignos y malignos pueden tener miles de millones de células, y los tumores metastáticos pueden invadir y crecer en numerosas partes del cuerpo, todas las células cancerosas en los tumores primarios y secundarios son clonales, lo que significa que se han originado de una célula ancestral común que había acumulado numerosas mutaciones. Este concepto es importante para entender las causas moleculares del cáncer y sus implicaciones para su diagnóstico.

Numerosos datos apoyan el concepto clonal del cáncer. Por ejemplo, las translocaciones recíprocas son características de muchos cánceres, como las leucemias y los linfomas, dos tipos de cáncer que implican células sanguíneas. Las células cancerosas de pacientes con **linfoma de Burkitt** muestran translocaciones recíprocas entre el cromosoma 8 (cuyo punto de rotura se encuentra cerca del gen *c-myc*) y los cromosomas 2, 14 y 22 (cuyo punto de rotura se encuentra cerca o dentro de uno de los genes de las inmunoglobulinas). Cada paciente afectado de linfoma de Burkitt muestra un punto de rotura propio en las secuencias de DNA de los genes *c-myc* y de las inmunoglobulinas; sin embargo, todas las células del linfoma de un mismo paciente contienen exactamente los mismos puntos de rotura. Esto demuestra que todas las células cancerosas de cada caso de linfoma de Burkitt provienen de una única célula, y que esta célula pasa esta aberración genética a su progenie.

Otra demostración de que las células cancerosas son clonales es su patrón de inactivación del cromosoma X. Como se explicó en el Capítulo 7, las hembras humanas son mosaicos, algunas de cuyas células contienen el cromosoma X paterno inactivado, mientras que otras tienen inactivado el cromosoma X materno. La inactivación del cromosoma X se produce pronto durante el desarrollo, y ocurre al azar. Todas las células cancerosas de un tumor, tanto en el tumor primario como en los metastáticos de una misma mujer, contienen el mismo cromosoma X inactivado. Esto apoya el concepto de que todas las células cancerosas de un paciente provienen de una célula común ancestral.

El cáncer es un proceso con múltiples pasos que requiere múltiples mutaciones

Aunque sabemos que el cáncer es una enfermedad genética iniciada por mutaciones que conducen a una proliferación celular incontrolada y a metástasis, una única mutación no es suficiente para transformar una célula normal en una célula maligna formadora de un tumor (tumorigénica). Si fuese suficiente con ello, el cáncer seria mucho más frecuente de lo que es. En los seres humanos, las mutaciones se producen espontáneamente a una tasa de unas 10^{-6} mutaciones por gen y por división celular, principalmente debido a errores intrínsecos en la replicación del DNA. Puesto que se producen aproximadamente 10^{16} divisiones celulares en el cuerpo humano durante la vida de una persona, ésta podría sufrir durante su vida hasta 10^{10} mutaciones por gen en alguna parte del cuerpo. Sin embargo, sólo una persona de cada tres sufrirá un cáncer.

El hecho de que la aparición de un cáncer esté relacionada con la edad es otra indicación de que el cáncer se desarrolla a partir de la acumulación de diversos sucesos mutagénicos en una sola célula. La incidencia de la mayoría de cánceres crece exponencialmente con la edad (Figura 18.2). Si para convertir

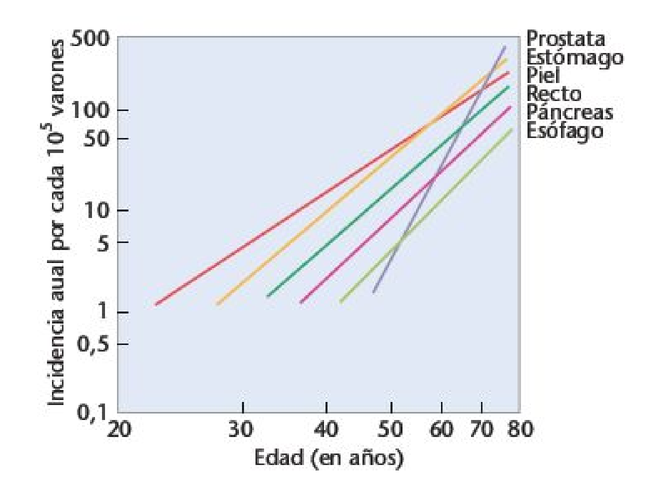


FIGURA 18.2 La incidencia de la mayoría de cánceres aumenta exponencialmente con la edad. Esta gráfica muestra que el logaritmo de la tasa de incidencia tiene una relación linear con el logaritmo de la edad de los pacientes.

una célula normal en maligna sólo fuese necesaria una mutación, la incidencia del cáncer sería independiente de la edad. Esta incidencia del cáncer relacionada a la edad sugiere que son necesarias hasta 10 mutaciones independientes producidas al azar y con una probabilidad baja para que una célula se transforme en una célula cancerosa maligna. Otra indicación de que el cáncer es un proceso con múltiples pasos es el retraso que hay entre la exposición a un **carcinógeno** (un agente que provoca cáncer) y la aparición del cáncer. Por ejemplo, hubo un periodo de incubación de 5 a 8 años entre la exposición de las personas a la radiación de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki y la aparición de leucemias. Del mismo modo, entre la década de 1930 y la de 1950, los pacientes de tuberculosis eran a menudo tratados con rayos X. Algunas de estas pacientes desarrollaron cáncer de mama, pero éste se inició con un retraso de unos 15 años después de los tratamientos.

La observación de que a menudo los cánceres se desarrollan en pasos sucesivos, de células ligeramente aberrantes a células cada vez más tumorigénicas y malignas, apoya la naturaleza en múltiples pasos del desarrollo del esta enfermedad. El desarrollo de cánceres cervicales (Figura 18.3) ilustra

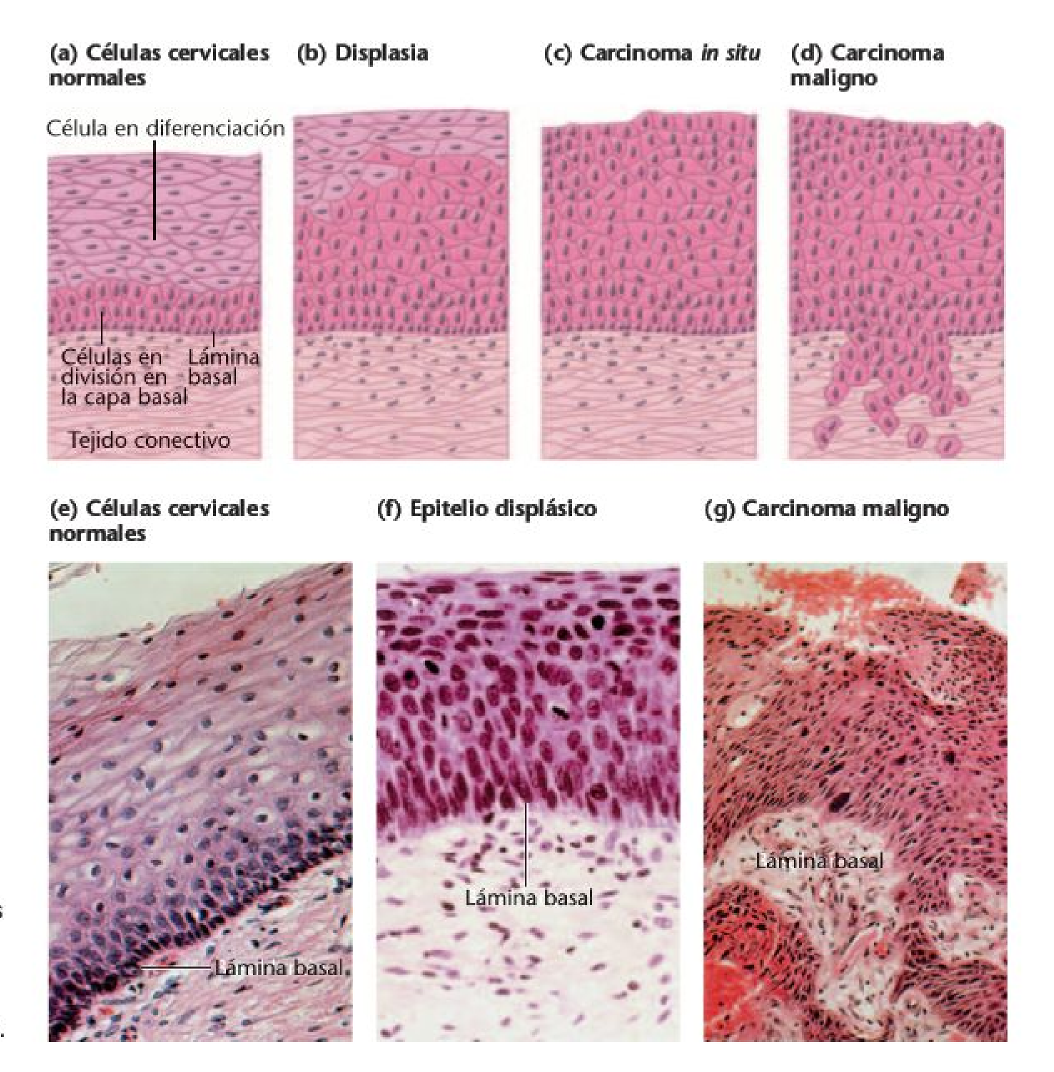


FIGURA 18.3 Estadios de desarrollo del cáncer cervical. (a) a (d) Etapas en la progresión desde el epitelio cervical normal hasta un carcinoma maligno. (e) a (g) Fotografías de microscopia óptica de muestras de biopsias cervicales. Observe las células invasivas en (g), que han cruzado la lámina basal (área clara en el centro) y han entrado en el tejido conectivo subyacente.

esta naturaleza progresiva del cáncer. En una cérvix normal, las células de la capa basal se dividen y se diferencian en células **quiescentes** (que no se dividen) que con el tiempo salen de la superficie de la cérvix. A veces, las células de la capa basal adquieren mutaciones que les permiten crecer de manera anormal, y pierden parte de su capacidad de diferenciarse y convertirse en quiescentes. Estas áreas con células que se dividen de manera anormal se denominan **displasias**. Si un área de displasia continúa así durante unos años, con las células proliferando todavía más, adquiriendo mutaciones y sin poder diferenciarse, se convierten en lo que se denomina un **carcinoma *in situ***. Hasta este estadio, tratar y curar un carcinoma cervical es relativamente sencillo. Sin embargo, en el 20-30 por ciento de los casos, los carcinomas *in situ* progresan gradualmente hasta la malignidad completa, caracterizada por células que se sueltan del tumor, atraviesan la lámina basal e invaden los tejidos adyacentes. En estos estadios tardíos, es mucho más difícil tratar un cáncer cervical invasivo.

Cada paso de la tumorigénesis (el desarrollo de un tumor maligno) parece ser el resultado de una o más alteraciones genéticas que van liberando progresivamente las células de los controles que normalmente operan sobre la proliferación y la malignidad. Como se verá en las siguientes secciones de este capítulo, los genes que experimentan las mutaciones que conducen al cáncer (denominados oncogenes o genes supresores de tumores) son los que controlan la reparación del DNA dañado, el ciclo celular, los contactos célula-célula y la muerte celular programada.

Ahora se tratará cada uno de estos procesos fundamentales, los genes que los controlan y cómo las mutaciones acaecidas en estos genes pueden conducir al cáncer.

¿CÓMO LO SABEMOS?

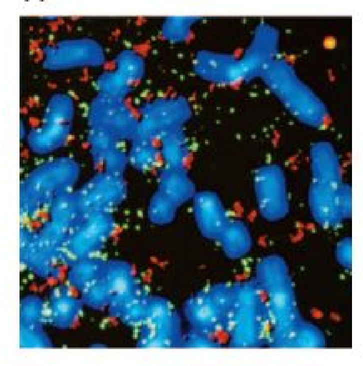
¿Cómo nos hemos dado cuenta que el cáncer es una enfermedad genética que se desarrolla en múltiples pasos?

18.2 Células cancerosas que contienen defectos genéticos que afectan a la estabilidad genómica y a la reparación del DNA

Las células cancerosas presentan tasas de mutación, de anormalidades cromosómicas y de inestabilidad genómica más altas que las normales. De hecho, muchos investigadores creen que el defecto fundamental de las células cancerosas es una alteración de la capacidad normal de reparar el DNA dañado. Esta pérdida de integridad genómica conduce a mutaciones en genes específicos que controlan diversos aspectos de la proliferación celular, de la muerte celular programada y de los contactos célula-célula. A su vez, la acumulación de mutaciones en los genes que controlan estos procesos conduce al cáncer. El alto nivel de inestabilidad genómica observado en las células cancerosas se conoce como **fenotipo mutador**.

La inestabilidad genómica en las células cancerosas se manifiesta en grandes defectos como translocaciones, aneuploidías, pérdidas cromosómicas, amplificación del DNA y deleciones cromosómicas (Figuras 18.1 y 18.4). Las células cancerosas que crecen en cultivos de laboratorio también muestran una gran cantidad de inestabilidad genómica, como duplicaciones y pérdida o translocaciones de cromosomas o de parte de ellos. A menudo las células cancerosas muestran defectos cromosómicos específicos, que se usan para diagnosticar el tipo de cáncer y el estadio en que se encuentra. Por ejemplo, los glóbulos blancos leucémicos de pacientes con **leucemia mielógena crónica** (**CML**) tienen una translocación específica, en la que el gen *C-ABL* del cromosoma 9 se ha translocado dentro del gen *BCR* del cromosoma 22. Esta translocación genera una estructura co-

(a) Diminutos dobles



(b) Región de tinción heterogénea

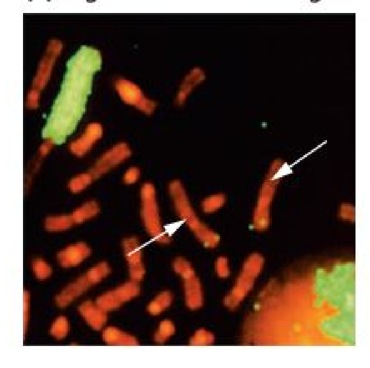


FIGURA 18.4 Amplificación de DNA en células de neuroblastoma. (a) Dos genes cancerosos (*MYCN* en rojo y *MDM2* en verde) se han amplificado en pequeños fragmentos de DNA que permanecen separados del DNA cromosómico dentro del núcleo. Estas unidades de DNA amplificado se denominan cromosomas diminutos dobles. Los cromosomas normales están teñidos en color azul. (b) Múltiples copias del gen *MYCN* están amplificadas en una gran región denominada región de tinción heterogénea (en verde). En los cromosomas paternos normales se pueden ver las copias sencillas del gen *MYCN* (flechas blancas). Los cromosomas normales están teñidos en color rojo.

nocida como **cromosoma Filadelfia** (Figura 18.5). El gen fusionado *BRC-ABL* codifica una proteína BRC-ABL quimérica. La proteína ABL normal es una **proteína quinasa** que actúa en rutas de transducción de señales, transfiriendo las señales de factores de crecimiento del medio externo al núcleo. La proteína BRC-ABL es una molécula anormal de transducción de señal en las células CML, que estimula constantemente estas células para que proliferen.

Continuando con el concepto de fenotipo mutador cancerígeno, diversos cánceres hereditarios son causados por defectos en genes que controlan la reparación del DNA. Por ejemplo, la xeroderma pigmentosum (XP) es una enfermedad hereditaria poco frecuente que se caracteriza por una sensibilidad extrema a la luz ultravioleta y a otros carcinógenos. A menudo, los pacientes con XP desarrollan cáncer maligno de piel. Las células de los pacientes con XP no pueden realizar la reparación por escisión de nucleótidos, y presentan mutaciones en cualquiera de los siete genes cuyos productos génicos son necesarios para llevar a cabo la reparación del DNA. Las células XP no tienen la capacidad de reparar lesiones de DNA como los dímeros de timina inducidos por luz UV. En el Capítulo 15 se describe la relación entre XP y los genes que controlan la reparación por escisión de nucleótidos.

Otro cáncer hereditario, el **cáncer colorectal no polipótico hereditario** (**HNPCC**) también es causado por mutaciones en los genes que controlan la reparación del DNA. HNPCC es un síndrome dominante autosómico que afecta a una de cada 200 personas. (Figura 18.6). Los pacientes afectados de HNPCC tienen más riesgo de desarrollar cáncer de colon, de ovario, de útero y de riñón. Las células de pacientes con HNPCC muestran una tasa de mutación y de inestabilidad cromosómica más alta de lo habitual. Hay al menos ocho genes asociados a HNPCC, y cuatro de ellos están relacionados con la reparación de emparejamientos erróneos del DNA. La inactivación de cualquiera de estos genes, MSH2, MSH6, MLH1 y MLH3, provoca una rápida acumulación de amplias mutaciones genómicas y el posterior desarrollo de cáncer colorectal y de otros tipos de cáncer.

La observación de que los defectos hereditarios en genes que controlan la reparación por escisión de nucleótidos y la reparación de emparejamiento erróneos del DNA conduce un incremento en la tasa de cáncer apoya la idea que el fenotipo mutador es un contribuyente importante para el desarrollo de cáncer.

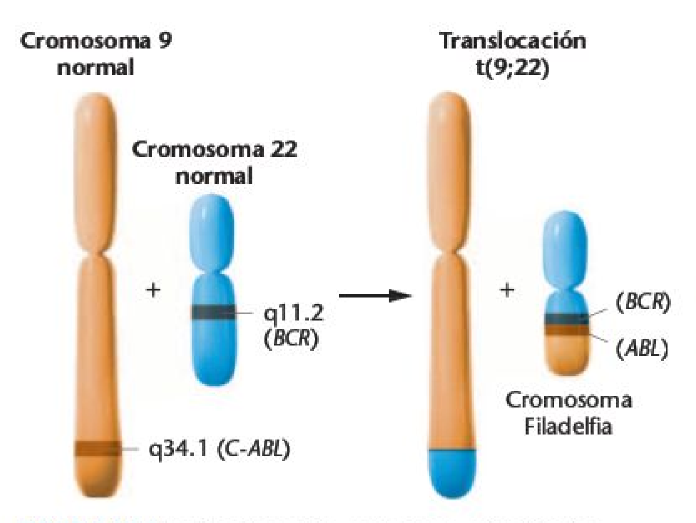


FIGURA 18.5 La translocación recíproca que implica los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 resulta en la formación de un cromosoma característico, el cromosoma Filadelfia, que está asociado a la leucemia mielógena crónica (CML). La translocación t(9;22) resulta en la fusión del protooncogén ABL del cromosoma 9 con el gen BRC del cromosoma 22. Esta proteína de fusión es una molécula híbrida potente que permite que las células escapen del control del ciclo celular, lo que contribuye al desarrollo de la CML.

Ahora resuelva esto

El Problema 18.17 de la página 525 le pregunta cómo se podría usar la proteína de fusión híbrida BRC-ABL, que se encuentra en los glóbulos blancos afectados de leucemia CML, de diana para la terapia de este tipo de cáncer.

Sugerencia: La mayoría de las terapias del cáncer, incluyendo la radiación y la quimioterapia, pretender matar las células que se dividen sin parar. Sin embargo, muchas células normales del cuerpo también se dividen, y mueren durante estas terapias, lo que provoca efectos colaterales. El hecho que la proteína de fusión BRC-ABL sólo se encuentre en los glóbulos blancos afectados de CML, proporciona una diana potencial específica de estas células cancerosas para la quimioterapia. Esta característica se ha usado de base para desarrollar nuevas terapias contra el cáncer. Si quiere saber más cosas de esta nueva terapia contra CML, denominada Gleevec, consulte *http://www.nci.nih.gov/newscenter/qandagleevec.*

18.3 Las células cancerosas contienen defectos genéticos que afectan a la regulación del ciclo celular

Una de las aberraciones fundamentales en todas las células cancerosas en la pérdida de control sobre la proliferación celular. La proliferación celular es el proceso de crecimiento y división celular que es esencial para el desarrollo y la reparación de los tejidos en todos los organismos pluricelulares. Aunque algunas células, como las células epidérmicas de la piel y los precursores sanguíneos de la médula ósea continúan creciendo y dividiéndose durante toda la vida del organismo, la mayor parte de las células de un organismo adulto se encuentran en un estado diferenciado de quiescencia, sin dividirse. Las células diferenciadas son aquellas que están especializadas en una función

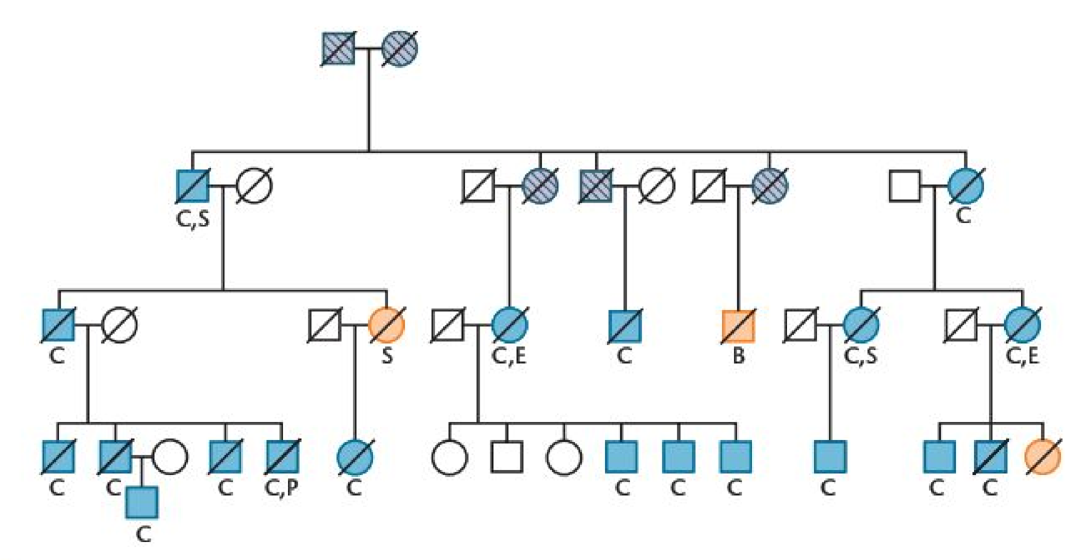


FIGURA 18.6 Árbol genealógico de una familia con HNPCC. Las familias con HNPCC son aquellas en que se ha diagnosticado cáncer de colon al menos en tres parientes en dos generaciones, siempre que al menos uno de los parientes diagnosticados tenga menos de 50 años. Cáncer de colon: C; Cáncer de estómago: S; cáncer de endometrio: E; cáncer de páncreas; P; cáncer de vejiga urinaria: B. Los símbolos azules indican miembros de la familia con cáncer de colon; los símbolos con líneas diagonales significan que el diagnóstico es dudoso; los símbolos naranjas indican otros tumores. Los símbolos tachados indican personas que han fallecido. *Reproducido con permiso de Aaltonen et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 260:812-816, Figura 1. Copyright 1993 AAAS.*

específica, como las células fotorreceptoras de la retina o las células cardíacas del corazón. El ejemplo más extremo de células no proliferativas son las células nerviosas, que no crecen ni se dividen, ni siquiera para reemplazar el tejido dañado[1]. En cambio, muchas células diferenciadas, como las del hígado o las del riñón, pueden crecer y dividirse si son estimuladas por señales extracelulares y factores de crecimiento. De esta manera, los organismos pluricelulares pueden reemplazar a las células muertas y a los tejidos dañados. Sin embargo, el crecimiento y la diferenciación de las células deben regularse de manera estricta; de otro modo, el crecimiento y la diferenciación de los órganos y tejidos se vería comprometido por tipos celulares inadecuados o en cantidades erróneas. La regulación normal sobre la proliferación celular implica un gran número de productos génicos que controlan las fases del ciclo celular, la muerte celular programada y la respuesta de las células a las señales externas de crecimiento. En las células cancerosas, muchos de los genes que controlan estas funciones se encuentran mutados o se expresan de manera aberrante, lo que conduce a una proliferación celular incontrolada.

[1] *Nota del traductor:* existen algunas excepciones a esta aseveración, como las neuronas del bulbo olfativo, que van siendo reemplazadas por crecimiento y diferenciación de células progenitoras de estirpe neural aunque sea a una tasa extremadamente lenta. Además, recientemente también se han encontrado células progenitoras de estirpe neural con capacidad de generar neuronas en otras localizaciones muy concretas del sistema nervioso central, como el hipocampo, el cuerpo estriado y la médula espinal, generalmente en contacto con los ventrículos cerebrales.

En esta sección se revisarán las fases del ciclo celular, algunos de los genes que las controlan, y cómo estos genes, cuando están mutados, conducen al cáncer.

Ciclo celular y transducción de señales

Como se describió en le Capítulo 2, el ciclo celular comprende los sucesos celulares que se producen entre una división celular y la siguiente (véase la Figura 2.5). El estadio de interfase del ciclo celular es el periodo de tiempo entre dos divisiones mitóticas. Durante este tiempo, la célula crece y replica su DNA. Durante la fase G1, la célula se prepara para DNA la síntesis de DNA, acumulando las enzimas y las moléculas requeridas para la replicación del DNA. A G1 le sigue la fase S, durante la que se replican los cromosomas de la célula. Durante la fase G2 la célula continúa creciendo y se prepara para la división. Durante la fase M, los cromosomas duplicados se condensan, los cromosomas hermanos se separan a los polos puestos y la célula se divide en dos.

Al inicio y a mediados de la fase G1, la célula toma la decisión de si entra en el siguiente ciclo celular o bien si se retira del ciclo celular y se mantiene quiescente. Las células que se dividen incesantemente no dejan nunca el ciclo celular, sino que continúan a través de las fases G1, S, G2 y M hasta que reciben las señales para dejar de proliferar. Si la célula deja de proliferar, entra en la fase G0 el ciclo celular. Durante G0, la célula permanece metabólicamente activa pero no crece ni se divide. La mayor parte de las células diferenciadas de los organismos pluricelulares pueden permanecer en G0 indefinidamente. Al-

gunas, como las neuronas, nunca vuelven a entrar en el ciclo celular. En cambio, las células cancerosas son incapaces de entrar en G0, y ciclan de manera continuada. Su tasa de proliferación no es necesariamente mayor que la de una célula proliferante normal; sin embargo, no pueden convertirse en quiescente en el momento o el lugar adecuados.

A menudo, las células en G0 pueden ser estimuladas por señales de crecimiento externas para volver a entrar en el ciclo celular. Determinadas moléculas como factores de crecimiento y hormonas que se unen a receptores de la superficie celular suministran estas señales a la célula, y estos receptores transmiten la señal desde la membrana plasmática hasta las moléculas de transducción de señales localizadas en el citoplasma. Generalmente, la transferencia de señales a través del citoplasma implica una cascada de fosforilaciones proteicas y de cambios conformacionales que envían la señal a través de una vía multiproteica que conduce al núcleo. En última instancia, la transducción de señal inicia un programa de expresión génica que hace que la célula salga de G0 y entre nuevamente en el ciclo celular. A menudo, las células cancerosas tienen defectos en las vías de transducción de señales. A veces tienen receptores de superficie celular o moléculas citoplasmáticas de transducción de señales anormales que envían continuamente señales de crecimiento al núcleo, incluso en ausencia de las señales de crecimiento externas. Además, puede ser que las células malignas no respondan a señales externas de las células vecinas, señales que normalmente inhiben la proliferación celular en un tejido maduro.

Control del ciclo celular y puntos de control

En las células normales, la progresión a través del ciclo celular está estrictamente regulada, y es necesario que se complete cualquier paso antes de que se pueda iniciar el siguiente. Hay al menos tres puntos diferentes del ciclo celular en los que la célula examina su equilibrio interno antes de continuar con el siguiente estadio del ciclo celular. Estos **puntos de control** se encuentran en **G1/S**, en **G2/M** y en **M** (Figura 18.7). En el punto de control G1/S, la célula examina su tamaño y determina si su DNA ha sido dañado. Si la célula no ha alcanzado un tamaño adecuado, o si su DNA está dañado, se detiene su marcha por el ciclo celular hasta que se corrijan estas condiciones. Si tanto el tamaño celular como la integridad del DNA son normales, se supera el punto de control G1/S y la célula entra en fase S. El segundo punto de control importante es el G2/M, en el que la célula examina sus condiciones fisiológicas antes de entrar en mitosis. Si no se ha completado la replicación del DNA o la reparación de los daños que pueda contener, el ciclo celular se detiene hasta que se completen estos procesos. El tercer punto de control importante se produce durante la mitosis, y se denomina punto de control M. En él se examina la formación del sistema de fibras de huso acromático y la unión de estas fibras a los cinetocoros asociados a los centrómeros. Si las fibras del huso no se han formado adecuadamente, o la unión a los cinotocoros no es correcta, se detiene la mitosis.

Además de la regulación en estos puntos de control del ciclo celular, hay dos clases de proteínas que regulan a marcha del ciclo celular: las **ciclinas** y las **quinasas dependientes de ciclinas** (**CDK**). La célula sintetiza y degrada cilcinas siguiendo un patrón preciso durante el ciclo celular (Figura 18.8). Cuando hay una ciclina, ésta se une a una CDK específica, estimulando la actividad del complejo CDK/ciclina. Entonces estos complejos fosforilan y activan selectivamente otras proteínas, que a su vez realizan los cambios necesarios para que la célula progrese por el ciclo ce-

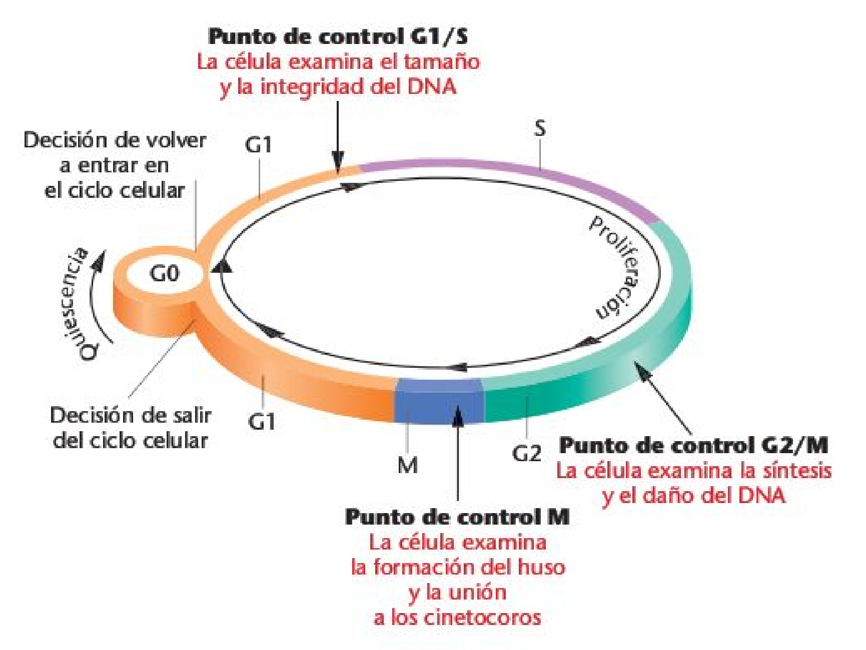


FIGURA 18.7 Los puntos de control y los puntos de decisión de proliferación examinan la progresión de la célula a través del ciclo celular.

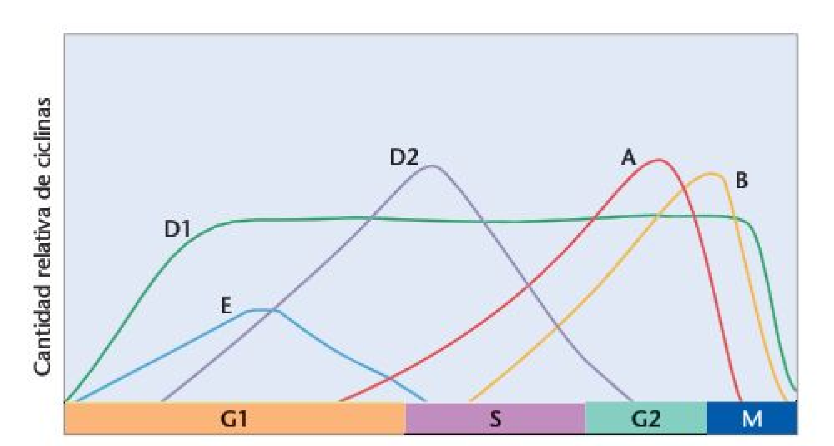


FIGURA 18.8 Momento relativo de expresión y cantidad relativa de las ciclinas durante el ciclo celular. La ciclina D1 se acumula al inicio de la fase G1 y se expresa a un nivel constante durante la mayor parte del ciclo celular. La ciclina E se acumula en G1, alcanza un pico, y disminuye a mediados de la fase S. La ciclina D2 empieza a acumularse en la segunda mitad de la fase G1, alcanza un pico justo después del inicio de la fase S, y luego disminuye al inicio de la fase G2. La ciclina A aparece al final de G1, se acumula durante la fase S, alcanza un pico durante la transición G2/M, y se degrada rápidamente. La ciclina B alcanza un pico en la transición G2/M y disminuye rápidamente durante la fase M.

lular. Por ejemplo, en la fase G1, los complejos CDK4/ciclina D activan las proteínas que estimulan la transcripción de grupos de genes cuyos productos (como la DNA polimerasa δ y la DNA ligasa) se requieren para que el DNA se replique durante la fase S. Otro complejo CDK/ciclina, el complejo CDK1/ciclina B, fosforila diversas proteínas que estimulan los sucesos de la mitosis inicial, como la rotura de la membrana nuclear, la condensación de los cromosomas y la reorganización del citoesqueleto (Figura 18.9). Sin embargo, la mitosis solo puede completarse cuando se degrada la ciclina B y se invierte la fosforilación proteica característica de la fase M. Aunque en las células hay un gran número de proteínas quinasa diferentes, solo unas pocas están implicadas en la regulación del ciclo celular.

Cada uno de los puntos de control del ciclo celular, así como también cada una de las actividades de las moléculas que controlan el ciclo celular, están genéticamente regulados. En general, el ciclo celular viene regulado por la interacción de genes cuyos productos promueven o inhiben la división celular. La presencia de mutaciones o la expresión errónea de cualquiera de los genes que controlan el ciclo celular contribuye al desarrollo de cáncer de diversas maneras. Por ejemplo, si los genes que controlan los puntos de control G1/S o G2/M son defectuosos, la célula puede continuar el ciclo antes de haber reparado los daños del DNA. Esto puede conducir a la acumulación de más mutaciones en genes que conduzcan a una proliferación incontrolada y a metástasis. Del mismo modo, si los genes que controlan la progresión por el ciclo celular, como los que codifican las ciclinas, se expresan inadecuadamente, la célula puede primar el continuar ciclando y ser incapaz de salir del ciclo celular y entrar en G0.

Como se acaba de describir, si la replicación o la reparación del DNA, o el ensamblaje de los cromosomas son aberrantes, la célula detiene su progresión por el ciclo celular hasta que se corrige esta condición. Esto reduce el número de mutaciones y de anomalías cromosómicas que se acumulan en las células en proliferación. Sin embargo, si el daño en el DNA o en los cromosomas en tan grave que no se puede reparar, la célula puede iniciar una segunda línea defensiva, un proceso denominado **apoptosis** o **muerte celular programada**. La apoptosis es un proceso controlado genéticamente en el que la célula se suicida.

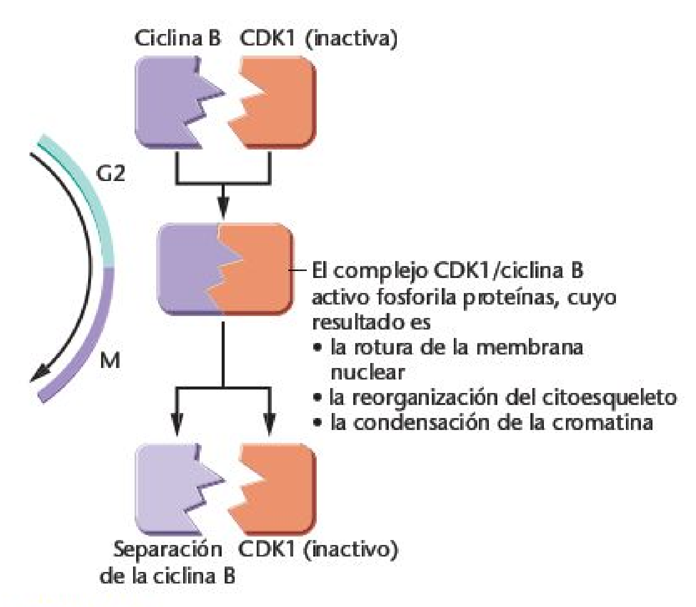


FIGURA 18.9 La transición de la fase G2 a la fase M es controlada por CDK1 y ciclina B. Estas moléculas interaccionan para formar un complejo que añade grupos fosfato a componentes celulares. A su vez, éstos realizan los cambios bioquímicos y estructurales necesarios para la mitosis (fase m).

La apoptosis también se inicia durante el desarrollo normal de los organismos pluricelulares, para eliminar determinadas células que no contribuyen al organismo adulto final. La apoptosis se diferencia de otros tipos de muerte celular, como la necrosis, en que la célula que muere no activa el sistema inmunitario del huésped. Los pasos de la apoptosis son los mismos tanto para las células dañadas como para las células eliminadas durante el desarrollo: se fragmenta el DNA nuclear, se rompen las estructuras celulares internas y la célula se disuelve es pequeñas estructuras esféricas denominadas cuerpos apoptóticos (Figura 18.10). El paso final es la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por las células fagocitarias del sistema inmunitario. Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de digerir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas **caspasas**. La apoptosis está genéticamente controlada, de modo que la regulación de productos génicos específicos como las proteínas Bcl12 y BAX puede estimular o evitar la apoptosis. Al eliminar las células dañadas, la muerte celular programada reduce el número de mutaciones que se propagan a la siguiente generación, incluidas las de los genes que causan cáncer. Los mismos genes que regulan los puntos de control del ciclo celular pueden estimular la apoptosis. Como veremos, estos genes se encuentran mutados en una amplia variedad de cánceres.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que el daño presente en el DNA contribuye de manera importante al desarrollo de cáncer?

18.4 Muchos genes que causan cáncer alteran el control del ciclo celular

En las células cancerosas hay dos categorías generales de genes mutados o que se expresan incorrectamente, los protooncogenes y los genes supresores de tumores (Tabla 18.2). Los **protooncogenes** son genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división celular. Codifican factores de transcripción que estimulan la expresión de otros genes, moléculas de transducción de señales que estimulan la división celular y reguladores del ciclo celular que hacen que la célula progrese a través de este ciclo. Los productos de los protooncogenes puede localizarse en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo, y sus actividades se controlan de diversas maneras, incluyendo la regulación a nivel transcripcional, traduccional y de modificación de la proteína. Cuando las células se convierten en quiescentes y dejan de dividirse, reprimen la expresión de la mayor parte de los productos de los protooncogenes. En las células cancerosas, uno o más de un protooncogén está alterado de manera que su actividad no puede ser controlada de manera normal. A veces esto es debido a una mutación en el protooncogén que resulta en un producto proteico que funciona de manera anormal. En otros casos, los protooncogenes pueden codificar productos proteicos normales, pero los genes se sobre-expresan y no pueden ser transcripcionalmente reprimidos en el momento correcto. En estos casos, el producto del protooncogén está continuamente activo, lo que estimula constantemente la célula a dividirse. Cuando un protooncogén está mutado o se expresa incorrectamente, y contribuye al desarrollo de un cáncer, pasa a denominarse **on-**

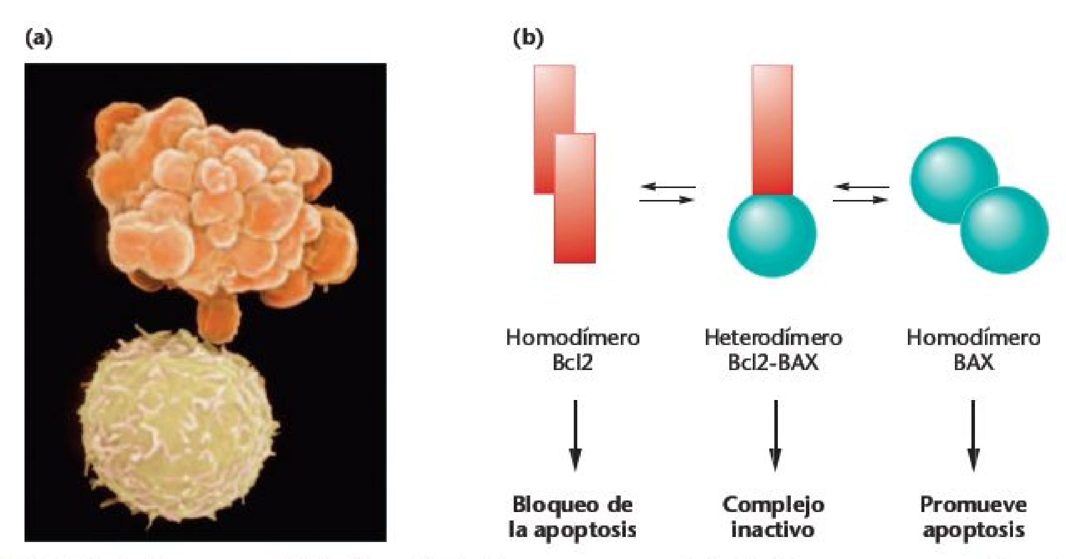


FIGURA 18.10 (a) Glóbulo blanco normal (abajo) y glóbulo blanco en apoptosis (arriba). Los cuerpos apoptóticos tienen el aspecto de un racimo de uva sobre la superficie celular. (b) La concentración relativa de las proteínas Bcl2 y BAX regula la apoptosis. En una célula normal la cantidad de Bcl2 y BAX está equilibrada, formándose heterodímeros inactivos. Un exceso relativo de Bcl2 resulta en homodímeros Bcl2, lo que evita la apoptosis. Las células cancerosas con sobreexpresión de Bcl2 son resistentes a quimioterapia y a radioterapia. Un exceso relativo de BAX resulta en homodímeros BAX, lo que induce apoptosis. En células normales, la proteína p53 activada induce la transcripción de BAX e inhibe la de Bcl2, lo que conduce a muerte celular. En muchas células cancerosas, p53 es defectuoso, lo que evita que la ruta apoptótica elimine las células cancerosas.

TABLA 18.2 **ALGUNOS PROTOONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES**

Protooncogén	Función normal	Alteración en cáncer	Cánceres asociados
Ha-ras	Molécula de transducción de señales, se une a GTP/GDP	Mutaciones puntuales	Colorectal, vejiga, muchos tipos
c-erbB	Receptor transmembrana de factores de crecimiento	Amplificación génica, mutaciones puntuales	Glioblastomas, mama, cervical
c-myc	Factor de transcripción, regula el ciclo ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis	Translocación, amplificación, mutaciones puntuales	Linfomas, leucemias, pulmón, muchos tipos
c-fos	Factor de transcripción, responde a los factores de crecimiento	Sobreexpresión	Osteosarcomas, muchos tipos
c-kit	Tirosina quinasa, transducción de señales	Mutación	Sarcomas
c-raf	Serina-treonina quinasa citoplsmática transducción de señales	Reorganizaciones cromosómicas	Estómago
RARα	Factor de transcripción dependiente de hormonas, diferenciación	Translocaciones cromosómicas del gen PML, producto de fusión	Leucemia promielocítoca aguda
E6	Oncogén codificado por el papillomavirus humano, inactiva p53	Infección de HPV	Cervical
MDM2	Se une a inactiva a p53, anula los puntos de control	Amplificación génica sobreexpresión	Osteosarcomas, liposarcomas
Ciclinas	Se unen a CDK, regulan el ciclo celular	Amplificación génica-sobreexpresión	Pulmón, esófago, muchos tipos
CDK2, 4	Quinasas dependientes de ciclinas, regulan las fases del ciclo celular	Sobreexpresión, mutación	Vejiga, mama, muchos tipos
Supresores de tumores	**Función normal**	**Alteración en cáncer**	**Cánceres asociados**
p53	Puntos de control del ciclo celular, apoptosis	Mutación, inactivación por productos oncogénicos víricos	Cerebro, pulmón, colorectal, mama, muchos tipos
RB1	Puntos de control del ciclo celular, se une a EF2	Mutación, deleción, inactivación por productos oncogénicos víricos	Retinoblastoma, osteosarcoma, muchos tipos
APC	Interacciones célula-célula	Mutación	Colorectal, cerebro, tiroides
Bcl2	Regulación de la apoptosis	La sobreexpresión bloquea la apoptosis	Linfomas, leucemias
XPA–XPG	Reparación por escisión de nucleótidos	Mutación	Xeroderma pigmentosum, piel
BRCA2	Reparación del DNA	Mutaciones puntuales	Mama, ovario, próstata

cogén (gen que causa cáncer). Los oncogenes son aquellos protooncogenes que han sufrido una alteración de ganancia de función. En consecuencia, un solo alelo mutado de un protooncogén mutado o expresado de manera incorrecta es suficiente para estimular un crecimiento incontrolado. Por eso, los oncogenes confieren un fenotipo canceroso dominante.

Los **genes supresores de tumores** son aquellos cuyos productos regulan, en condiciones normales, los puntos de control del ciclo celular, e inician el proceso de apoptosis. En las células normales, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño en el DNA o a señales de supresión del crecimiento provenientes del medio extracelular. Cuando los genes supresores de tumores están mutados o son inactivos, las células no pueden responder normalmente a los puntos de control del ciclo celular, o son incapaces de realizar muerte celular programada si el daño del DNA es demasiado importante. Esto conduce a un incremento en las mutaciones y a la incapacidad de la célula de dejar el ciclo celular cuando debería convertirse en quiescente. Cuando los dos alelos de un gen supresor de tumores son inactivos, y hay otros cambios en la célula que la mantienen creciendo y dividiéndose, las células pueden convertirse en tumorigénicas.

A continuación se presentan algunos ejemplos de protooncogenes y de genes supresores de tumores que cuando están mutados contribuyen al cáncer. Se conocen más de 200 oncogenes y de genes supresores de tumores, y probablemente se descubrirán más al continuar la investigación sobre el cáncer.

Los protooncogenes *Ciclina D1* y *Ciclina D*

Como se ha tratado anteriormente en este capítulo, las ciclinas se sintetizan y se degradan durante todo el ciclo celular. Forman complejos con las moléculas CDK, y regulan sus actividades. Estos complejos CDK/ciclina son reguladores importantes de todas las fases del ciclo celular. Se sabe que diversas ciclinas están asociadas al desarrollo de cáncer. Por ejemplo, el gen que codifica la ciclina D1 se encuentra amplificado en diversos cánceres, entre los que cabe incluir el de mama, de vejiga, de pulmón y de esófago. La amplificación de DNA genera múltiples copias del gen *ciclina D1*, y por eso puede conducir a unos niveles de proteína ciclina D1 más altos de lo normal. Niveles altos de proteína ciclina D1 pueden contribuir a la entrada incontrolada a la fase S. En otros cánceres, la *ciclina D1* se sobre-expresa incluso en ausencia de amplificación génica. En determinados tumores paratiroideos y linfomas de células B, el gen *ciclina D1* está implicado en aberraciones cromosómicas como translocaciones. Estas alteraciones en el gen *ciclina D1* también puede provocar que se exprese de manera anormal. De manera parecida, el gen *ciclina E* se encuentra amplificado o se sobre-expresa en algunas leucemias y cánceres de mama y de colon. Es posible que la sobre-expresión de estos reguladores clave del ciclo celular, o la pérdida de su degradación periódica, mantenga las células en un ciclo celular continuo, y no deje que salgan de él, que entren en la fase G0 de quiescencia, o que se diferencien.

Los protooncogenes *ras*

Unos de los genes que se encuentran mutados con más frecuencia en los tumores humanos son los de la familia génica *ras*. Estos genes se encuentran mutados en más del 40 por ciento de los tumores humanos. La familia génica *ras* codifica moléculas de transducción de señales que están asociadas a la membrana celular y que regulan el crecimiento y la división celular. Normalmente, las proteínas Ras transmiten señales de la membrana celular al núcleo, estimulando a la célula a dividirse en respuesta a factores de crecimiento externos. Las proteínas ras ciclan entre un estado inactivo (desconectadas) y un estado activo (conectadas) al estar unidas a GDP o a GTP, respectivamente. Cuando una célula encuentra un factor de crecimiento (como el factor procedente de plaquetas —*platelet growth factor*— o el factor de crecimiento epidérmico —*epidermal growth factor*—), los receptores de los factores de crecimiento de la membrana celular se unen a ellos, lo que provoca la autofosforilación de la porción citoplasmática del receptor. Esto provoca el reclutamiento de proteínas conocidas como factores de intercambio de nucleótidos en la membrana plasmática. Estos factores de intercambio de nucleótidos hacen que Ras libere GDP y se una a GTP, activándose. La forma activa de Ras unida a GTP envía sus señales a través de cascadas de fosforilaciones proteicas en el citoplasma (Figura 18.11). El final de estas cascadas es la activación de factores de transcripción que estimulan la expresión de genes cuyos productos conducen las células del estado de quiescencia al ciclo celular. Una vez Ras ha enviado sus señales al núcleo, hidroliza GTP a GDP y se vuelve inactivo. Las mutaciones que convierten el protooncogén ras en un oncogén evitan que la proteína Ras hidrolice el GTP en GDP, manteniendo siempre la proteína Ras en su conformación activa, lo que estimula constantemente la célula a dividirse. La comparación de la secuencia aminoacídica de las proteínas Ras entre células normales y cancerosas revela que las proteínas Ras oncogénicas tienen sustituciones de un único aminoácido en posición 12 ó 61 (Figura 18.12). Cada uno de estos cambios aminoacídicos puede generarse por una sustitución nucleotídica en el gen *ras* (Figura 18.13).

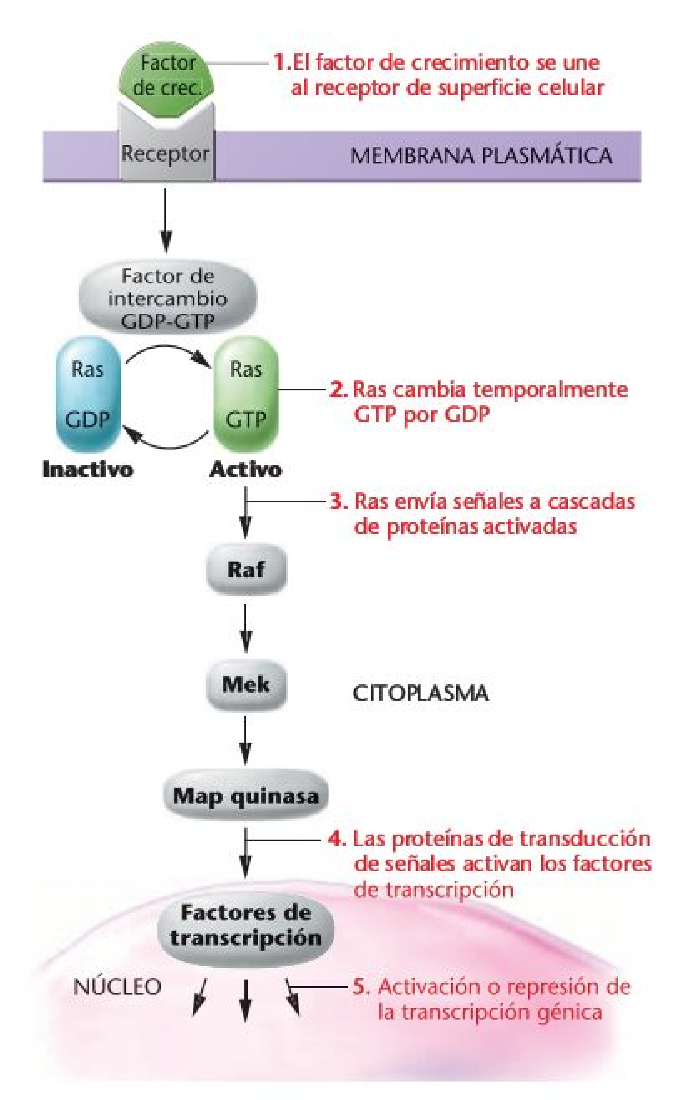


FIGURA 18.11 Ruta de transducción de señales mediada por Ras.

El gen supresor de tumores *p53*

El gen que se encuentra mutado con más frecuencia en los cánceres humanos, en más del 50 por ciento de todos los cánceres, es el gen ***p53***. Este gen codifica una proteína nuclear que actúa de factor de transcripción reprimiendo o estimulando la transcripción de más de 50 genes (Figura 18.14).

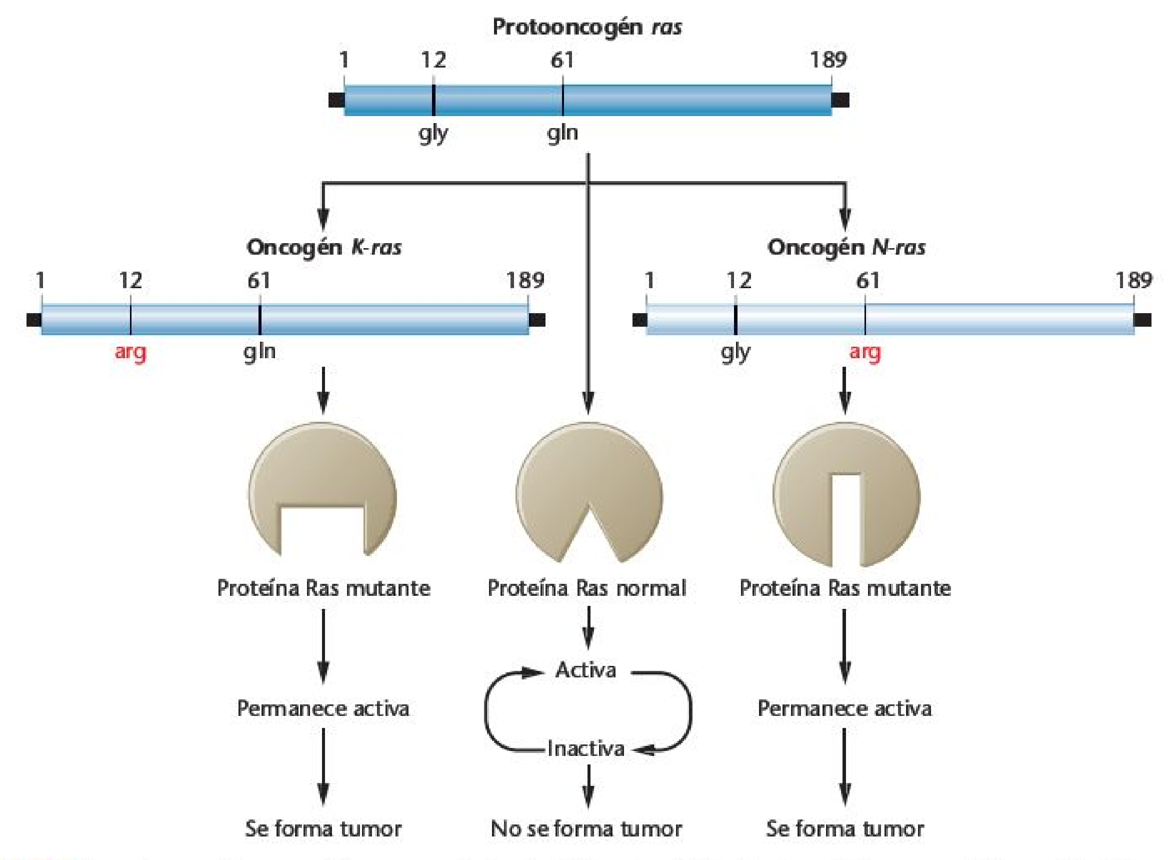


FIGURA 18.12 El protooncogén *ras* codifica una proteína de 189 aminoácidos. En la proteína normal, la posición 12 contiene una glicina, y la posición 61 una glutamina. Las proteínas Ras de diversos tumores contienen sustituciones de un solo aminoácido en una de estas dos posiciones. Estas mutaciones convierten el protooncogén *ras* en un oncogén promotor de tumores. Los alelos mutantes de este protooncogén son *K-ras* y *N-ras*.

Normalmente, la proteína p53 se sintetiza de forma continua, pero se degrada rápidamente y por consiguiente se encuentra en las células en cantidades muy pequeñas. Además, la proteína p53 suele estar unida a otra proteína denominada Mdm2, que evita las fosforilaciones y las acetilaciones que convierten la proteína p53 de la forma inactiva en la activa. Diversos tipos de sucesos pueden provocar un rápido incremento del nivel nuclear de la proteína p53 activada, como la presencia de daños en el DNA, roturas de la doble cadena de DNA inducidas por radiación ionizante o la presencia de intermediarios de la reparación del DNA generados por la exposición de las células a luz ultravioleta. El incremento de proteína p53 activada es el resultado del incremento de su fosforilación, acetilación o estabilidad.

La proteína p53 inicia dos respuestas diferentes ante daños en el DNA: detiene el ciclo celular y estimula la reparación de los daños, o estimula la apoptosis y la muerte celular si los daños no pueden ser reparados. Estas dos respuestas se realizan mediante la acción de p53 actuando como factor de transcripción, que estimula o reprime la expresión de los genes implicados en estas respuestas.

En las células normales, p53 puede detener el ciclo celular en diferentes fases. Para detener el ciclo celular en el punto de control G1/S, la proteína p53 activada estimula la transcripción del gen que codifica la proteína p21. La proteína p21 inhibe el complejo CDK4/ciclina D1, lo que evita que la célula pase de la fase G1 a la fase S. La proteína p53 activada también regula la expresión de genes que retardan el avance de la replicación del DNA, lo que concede un tiempo suplementario a la reparación del DNA durante la fase S. Si el daño en el DNA se produce durante la fase S, p53 activada puede bloquear las células en el punto de control G2/M regulando la expresión de otros genes.

P53 activada también puede ordenar a la célula dañada que cometa suicidio por apoptosis. Esto lo consigue activando la transcripción del gen *Bax* y reprimiendo la expresión del gen *Bcl2*. En las células normales, la proteína BAX se encuentra formando un heterodímero con la proteína Bcl2, y la célula es viable. Cuando p53 estimula la transcripción del gen Bax, los niveles de proteína BAX se incrementan, se forman homodímeros BAX y éstos activan los cambios celulares que conducen a la autodestrucción celular (Figura 18.10). En las células cancerosas que carecen de p53 funcional, los niveles de proteína BAX no se incrementan en respuesta a daños celulares, por lo que la apoptosis no se puede producir.



FIGURA 18.13 Imagen tridimensional generada por ordenador de la proteína Ras en dos conformaciones diferentes. La proteína Ras normal actúa de interruptor molecular controlando el crecimiento y la diferenciación celular. Cuando la proteína está unida a GTP, el interruptor está conectado (conformación de color azul), y cuando GTP se hidroliza en GDP el interruptor está desconectado (conformación de color amarillo). El cambio entre estos estados altera la conformación de la proteína en estas dos regiones (en azul y amarillo). Las proteínas Ras mutantes están atascadas en el estado activado, lo que hace que estén enviando continuamente señales de crecimiento celular.

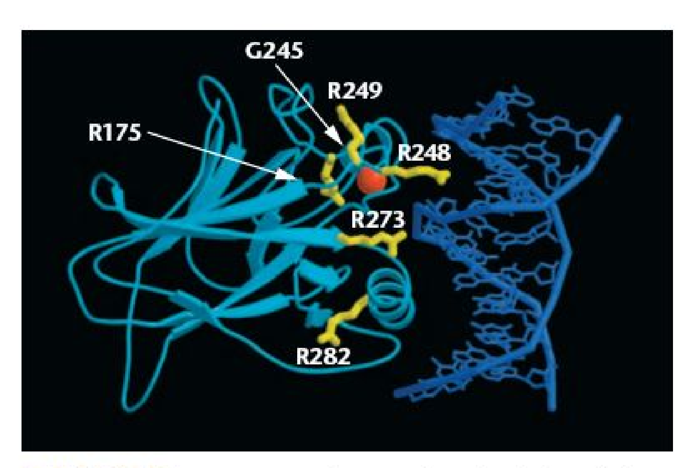


FIGURA 18.14 Imagen generada por ordenador de la proteína p53 (izquierda) formando un complejo con el DNBA (derecha), donde se muestran las seis regiones que mutan con más frecuencia. R es la abreviación de la arginina, y G de la glicina. Los números representan la posición aminoacídica de las mutaciones.

Por eso, las células que carecen de p53 funcional son incapaces de detener el ciclo celular en los puntos de control o de hacer que la célula entre en apoptosis en respuesta a daños en el DNA. En consecuencia, las células progresan por el ciclo celular sin que se produzcan los controles, sin tener en cuenta la condición de su DNA. Las células que carecen de p53 tienen una tasa de mutación más alta, y acumulan los tipos de mutaciones y de aberraciones cromosómicas que conducen al cáncer. Dada la importancia del gen p53 para la integridad genómica, a menudo se la denomina «guardiana del genoma».

El gen supresor de tumores *RB1*

La pérdida o la mutación del gen supresor de tumores ***RB1*** (***retinoblastoma 1***) contribuye al desarrollo de muchos cánceres, incluidos los de mama, óseos, pulmón y vejiga. El gen *RB1* se identificó originalmente como resultado de estudios de retinoblastoma, una enfermedad hereditaria que provoca el desarrollo de tumores en los ojos en niños. El retinoblastoma ocurre con una frecuencia de 1 de 14.000 a 20.000 personas. En la forma familiar de la enfermedad las personas heredan un alelo mutado del gen RB1, y tienen un 85 por ciento de posibilidades de desarrollar retinoblastoma, y un incremento en la probabilidad de desarrollar otros cánceres. Todas las células somáticas de los pacientes con retinoblastoma hereditario contienen un alelo mutado del gen *RB1*. Sin embargo, sólo cuando el segundo alelo del gen *RB1*, que es normal, se pierde o muta en determinadas células de la retina, se desarrolla el retinoblastoma. El alelo silvestre puede inactivarse por la mutación de un único par de bases, una deleción o por otro tipo de aberración cromosómica. En las personas que no tienen esta condición hereditaria, el retinoblastoma es extremadamente poco frecuente, ya que requiere que se produzcan dos mutaciones somáticas independientes en una misma célula de la retina para que se inactiven las dos copias del gen *RB1* (Figura 18.15).

La **proteína retinoblastoma** (**pRB**), como la proteína p53, es una proteína supresora de tumores que controla el punto de control G1/S del ciclo celular. La proteína pRB se encuentra en el núcleo de todos los tipos celulares en todos los estadios del ciclo celular. Sin embargo, su actividad varía durante el ciclo celular, en función de su estado de fosforilación. Cuando las células se encuentran en la fase G0 del ciclo celular, la proteína pRB no está fosforilada, y se une a factores de transcripción como E2F, inactivándolos (Figura 18.16). Cuando factores de crecimiento estimulan la célula, entra en G1 y se aproxima a la fase S. Durante la fase G1, el complejo CDK4/ciclina D1 fosforila la proteína pRB. La proteína pRB fosforilada es inactiva, y libera las proteínas reguladoras que mantenía unidas. Cuando E2F y las otras proteínas reguladoras son liberadas, pueden inducir la expresión de más de 30 genes cuyos productos son requeridos para la transición de la fase G1 a la fase S. Cuando la célula pasa por las fases S, G2 y M, pRB vuelve al estado no fosforilado, se une a proteínas reguladoras como E2F, y las mantiene secuestradas hasta que son requeridas para el siguiente ciclo celular. En células normales quiescentes, la proteína pRB es activa y previene la entrada a la fase S. En muchas células cancerosas, incluidas las células con retinoblastoma, ambas copias del gen RB1 son defectivas o están ausentes, y la progresión por el ciclo celular no está regulada.

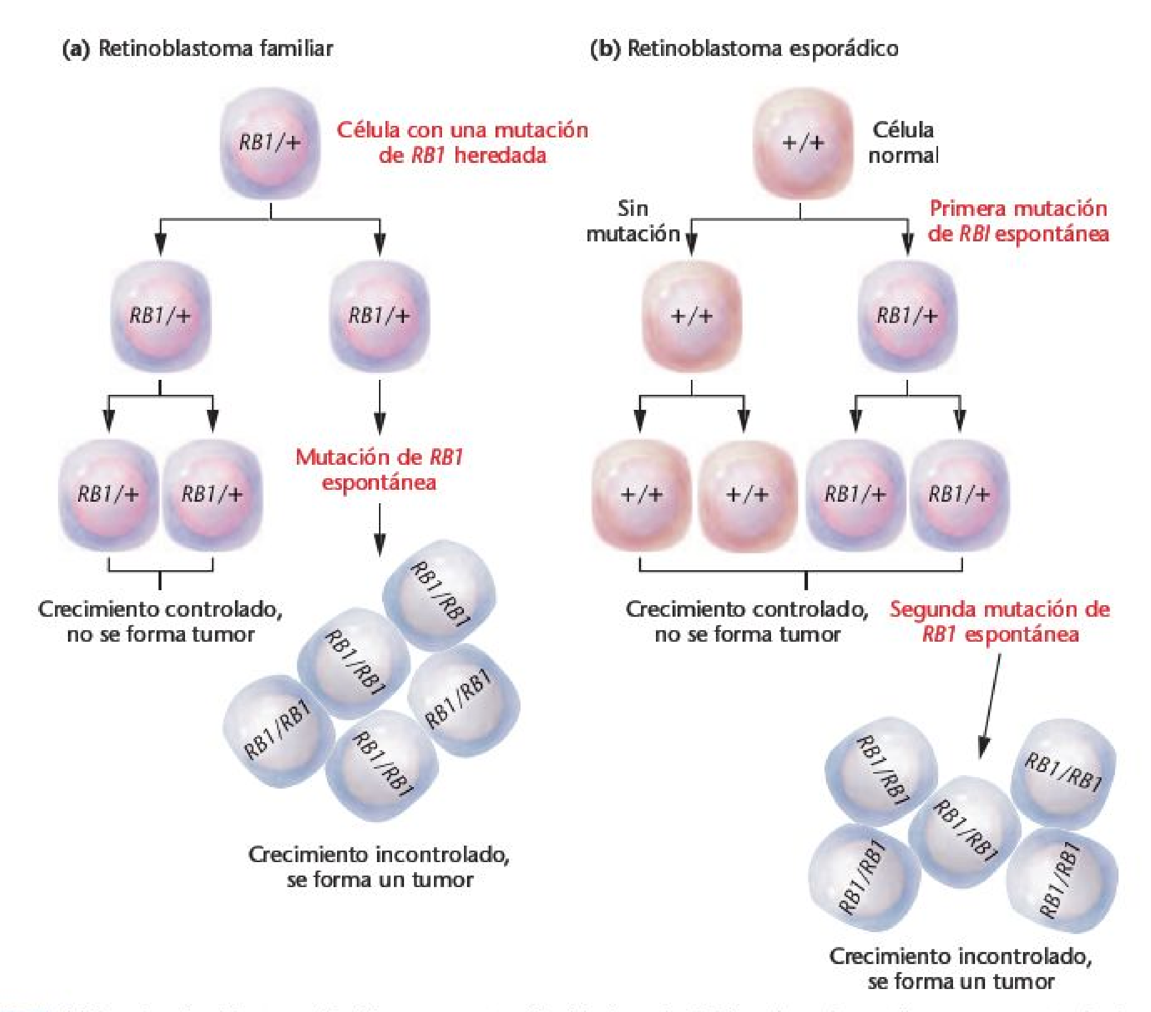


FIGURA 18.15 (a) En el retinoblastoma familiar, una mutación (designada *RB1*) se hereda y está presente en todas las células. Una segunda mutación en el locus del retinoblastoma de cualquier célula retinal contribuye a un crecimiento celular incontrolado y a la formación de un tumor. (b) En el retinoblastoma esporádico, se adquieren dos mutaciones independientes y secuenciales en los alelos del retinoblastoma de una misma célula, lo que también conduce a la formación del tumor.

Ahora resuelva esto

El Problema 18.23 de la página 525 le pide que explique cómo en el síndrome de Li-Fraumeni, que es hereditario, mutaciones en un alelo del gen p53 pueden generar una amplia gama de cánceres diferentes.

Sugerencia: Para responder a esta pregunta, debe repasar las funciones celulares reguladas por el gen supresor de tumores p53 normal. Considere cómo puede verse afectada cada una de estas funciones si el producto génico de p53 está ausente o es defectuoso. Para entender cómo las mutaciones en un alelo de un gen supresor de tumores resultan en tumores que contienen aberraciones en ambos alelos, lea la Sección 18.6 sobre la pérdida de heterocigosidad.

18.5 El cáncer es una enfermedad genética que afecta los contactos célula-célula

Como se discutió al inicio de este capítulo, el crecimiento incontrolado por sí mismo es insuficiente para generar un cáncer maligno que ponga la vida del afectado en riesgo. Las células cancerosas también deben adquirir las características de la metástasis, que incluyen la capacidad de desprenderse del tumor original, entrar en el sistema sanguíneo o en el linfático, invadir los tejidos adyacentes y desarrollar tumores secundarios. Para dejar el sitio del tumor primario e invadir otros tejidos, las células tumorales deben digerir componentes de la **matriz extracelular** y de la **lámina basal**, que normalmente contienen y separan los tejidos (Figura 18.17). La matriz extracelular y la lámina basal están formados por proteínas y carbohidratos, y forman el andamio para el crecimiento de los tejidos, y normalmente inhiben la migración celular.

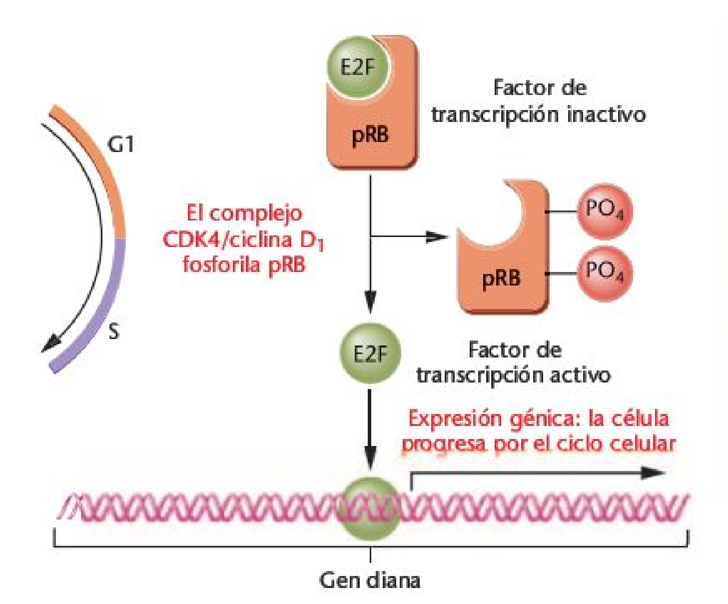


FIGURA 18.16 En el núcleo, durante la fase G1, pRB interacciona con el factor de transcripción E2F y lo inactiva. Al progresar la célula de la fase G1 a la fase S, se forma el complejo CDK4/ciclina D1, que añade grupos fosfato a pRB. Al forsforilarse pRB, E2F se libera y se vuelve transcripcionalmente activo, lo que permite que la célula pase a través de la fase S. La fosforilación de pRB es transitoria; al degradarse los complejos CDK/ciclina y al progresar la célula por el ciclo celular hasta el inicio de la fase G1, la fosforilación de pRB disminuye.

Algunos tipos celulares normales también tienen la capacidad de invadir la matriz extracelular. Por ejemplo, la implantación del embrión en la pared uterina durante el embarazo requiere de emigración celular a través de la matriz extracelular. Además, los glóbulos blancos sanguíneos alcanzan el sitio de la infección cruzando la pared de los capilares. Probablemente, los mecanismos de invasión son muy parecidos en estas células normales y en las cancerosas. La diferencia es que en las células normales, la capacidad invasiva está fuertemente regulada, mientras que en las células tumorales se ha perdido esta regulación.

Aunque se sabe mucho menos sobre los genes que controlan la metástasis que sobre los que controlan el ciclo celular, es probable que la metástasis sea controlada por un gran número de genes, incluidos los que codifican moléculas de adhesión celular y enzimas proteolíticas. Por ejemplo, los tumores epiteliales tienen un nivel inferior al normal de la glucoproteína E-caderina, que es responsable de la adhesión célula-célula en los tejidos normales. Además, en los tumores especialmente malignos algunas enzimas proteolíticas como las **metaloproteinasas** se encuentran presentes en niveles más altos que los normales, y no son sensibles a los controles normales conferidos por moléculas reguladoras como los **inhibidores tisulares de metaloproteinasas** (TIMP). Se ha mostrado que el grado de agresividad de un tumor presenta una correlación positiva con el nivel de enzimas proteolíticas que expresa el tumor. Por eso, la expresión inadecuada de moléculas de adhesión celular y de enzimas proteolíticas puede ayudar a que

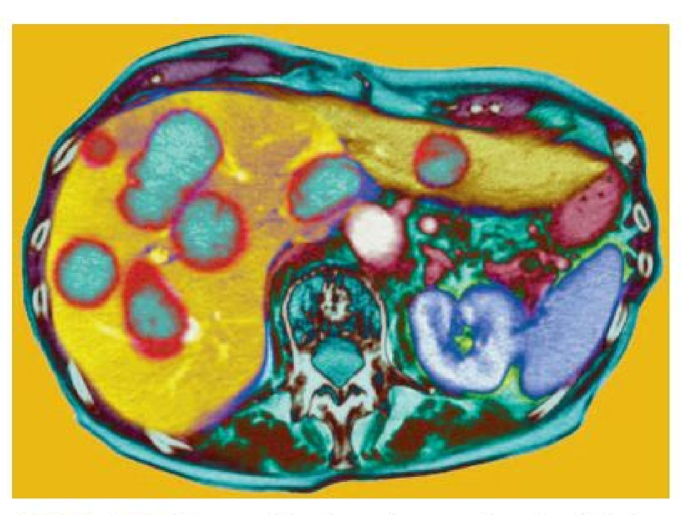


FIGURA 18.17 Tomografía coloreada por ordenador (CT) de un paciente con diversos tumores metastáticos en el hígado. Los tumores se ven como estructuras redondeadas de color azul pálido rodeadas de color rojo; el hígado se muestra de color amarillo. Los tumores secundarios se propagan a partir de un tumor primario localizado en cualquier sitio. La columna vertebral se ve como una estructura azul pálido en la parte inferior central de la imagen. Se observas trozos de las costillas como óvalos azul pálido localizados alrededor de los márgenes de la imagen.

las células tumorales relajen las restricciones normales de localización celular y generen agujeros por los que las células tumorales puedan pasar y llegar al sistema circulatorio.

Ahora resuelva esto

El Problema 18.25 de la página 525 describe el aislamiento de un gen que se encuentra mutado en tumores metastáticos. Este gen parece ser miembro de una familia de serina proteasas. Se le pide que conjeture sobre cómo puede contribuir este gen al desarrollo de cánceres altamente invasivos.

Sugerencia: Como ha aprendido en esta sección, las células cancerosas metastáticas tienen la capacidad de escapar a las adhesiones con otras células, de viajar a través del sistema circulatorio y de invadir tejidos distantes. Debe considerar qué tipos de procesos metastáticos se ven facilitados por el hecho de tener una molécula proteásica que carece de su regulación normal. Considere también qué tipos de mutaciones en este gen pueden conducir a un incremento en la metástasis.

18.6 La predisposición a algunos cánceres puede ser hereditaria

Aunque la inmensa mayoría de los cánceres humanos son esporádicos, una pequeña fracción (entre el 1 y el 2 por ciento de

todos los cánceres) tienen un componente familiar o hereditario. Actualmente se conocen unos 50 tipos de cánceres hereditarios (Tabla 18.3).

La mayoría de los genes de susceptibilidad al cáncer, aunque se transmiten de forma mendeliana dominante, no son suficientes por sí mismos para estimular el desarrollo de un cáncer. Es necesario que se produzca al menos otra mutación somática en la otra copia del gen para que la célula empiece el camino de la tumorigénesis. Además, generalmente es necesario que se produzcan también mutaciones en otros genes para que se exprese completamente el fenotipo canceroso. Como se ha mencionado con anterioridad, las mutaciones hereditarias en el gen *RB1* predisponen al desarrollo de diversos tipos de cáncer. Aunque las células somáticas normales de estos pacientes son heterocigotas para la mutación RB1, sus tumores contienen mutaciones en ambas copias del gen. La segunda mutación somática puede ser una mutación puntual, una deleción o una alteración del gen causada por una aberración cromosómica. El fenómeno de mutación tumoral del segundo alelo, el silvestre, se denomina **pérdida de heterocigosidad**. Aunque la pérdida de heterocigosidad es un primer paso esencial para la expresión de estos cánceres hereditarios, hace falta que se produzcan otras mutaciones en otros protooncogenes y genes supresores de tumores para que las células tumorales cambien en células completamente malignas.

El desarrollo de cáncer de colon hereditario ilustra como las mutaciones hereditarias de un alelo de un gen contribuyen sólo a uno de los pasos del camino que conduce a la malignidad.

Aproximadamente el 1 por ciento de los casos de cáncer de colon son el resultado de una predisposición genética a un tipo de cáncer conocido como **poliposis adenomatosa familiar (FAP)**. En el FAP, se hereda una copia mutante del gen *APC* (poliposis adenomatosa), que se localiza en el brazo largo del cromosoma 5. Las mutaciones incluyen deleciones, cambios de fase de lectura y mutaciones puntuales. La función normal del producto del gen *APC* es actuar de supresor de tumores controlando los contactos célula-célula e inhibiendo el crecimiento mediante la interacción con la proteína β-catenina. La presencia de una mutación *APC* en heterocigosis hace que las células epiteliales del colon escapen parcialmente al control del ciclo celular, y la célula se divide para formar un pequeño grupo de células denominadas **pólipo** o adenoma. Las personas que son heterocigotas para esta condición cientos o miles de pólipos en el colon y en el recto al principio de su vida (Figura 18.18). En el FAP, cada pólipo es un clon de células que llevan todas ellas una mutación *APC*, y el desarrollo de pólipos es un carácter dominante. Aunque en este estadio no es necesario que el segundo alelo del gen APC esté mutado, el segundo alelo *APC* se convierte en mutante en los estadios posteriores de desarrollo de este cáncer. Con el tiempo, algunos pólipos adquieren una serie de mutaciones que conviertes estos pólipos benignos en tumores malignos. En la Figura 18.19 se muestra el orden relativo de las mutaciones durante el desarrollo del FAP.

La segunda mutación en las células del pólipo que contienen una mutación en el gen *APC* ocurre en el protooncogén *ras*. El producto del gen *ras* estimula el crecimiento y la división celular trasmitiendo señales de crecimiento desde la superficie celular hasta el núcleo. La combinación de las mutaciones en los genes *APC* y *ras* dispara el desarrollo de adenomas intermedios. Estos adenomas presentan defectos en la diferenciación celular normal y crecerán en condiciones de cultivo en ausencia de contacto con otras células, y por eso se describen como **transformados**. El ter-

TABLA 18.3 PREDISPOSICIONES HEREDITARIAS AL CÁNCER

Síndromes de predisposición al cáncer	Cromosoma
Cáncer de mama familiar de aparición temprana	17q
Poliposis adenomatosa familiar	5q
Melanoma familiar	9p
Síndrome de Gorlin	9q
Cáncer de colon no polipótico hereditario	2p
Síndrome de Li-Fraumeni	17p
Neoplasia endocrina múltiple de tipo 1	11q
Neoplasia endocrina múltiple de tipo 2	22q
Neurofibromatosis de tipo 1	17q
Neurofibromatosis de tipo 2	22q
Retinoblastoma	13q
Síndrome de von Hippel–Lindau	3p
Tumor de Wilms	11p

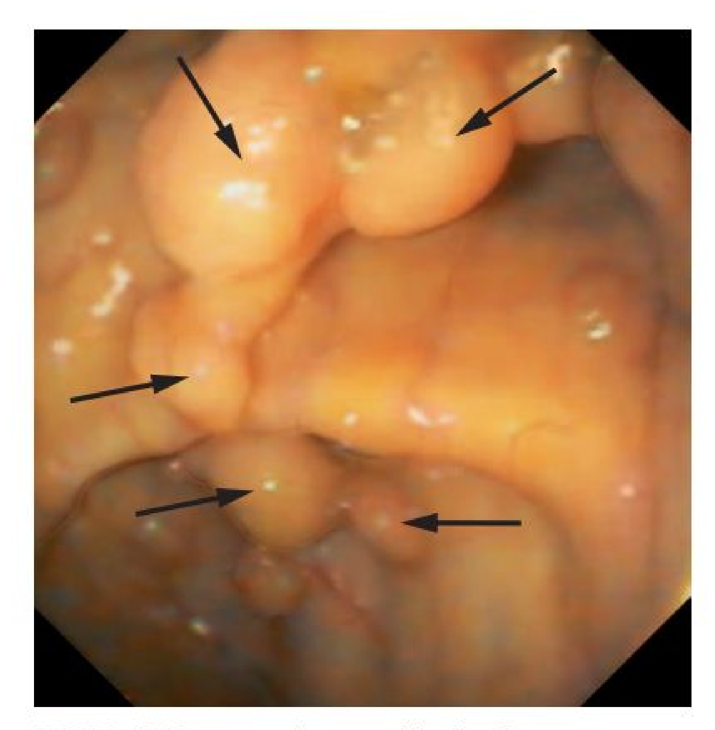


FIGURA 18.18 Vista endoscópica del colon de un paciente con poliposis familiar. Pueden crecer cientos de pólipos en el revestimiento del colon, algunos de los cuales se desarrollan en cáncer. Las flechas indican los pólipos.

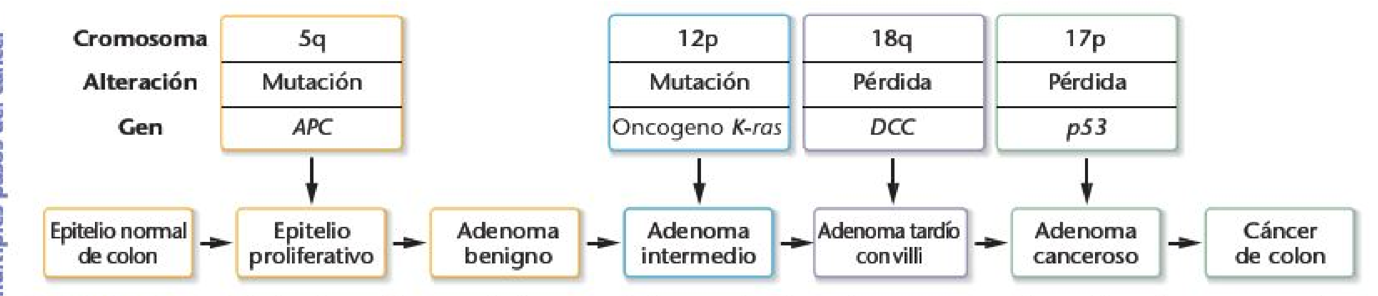


FIGURA 18.19 Modelo de desarrollo en múltiples pasos del cáncer de colon. El primer paso es la pérdida o la inactivación de un alelo del gen *APC* del cromosoma 5. En los casos de FAP, se hereda un alelo mutante *APC*. Mutaciones posteriores en genes de los cromosomas 12, 17 o 18 en células de los adenomas benignos pueden conducir a una transformación maligna cuyo resultado es un cáncer de colon. Aunque las mutaciones en los cromosomas 12, 17 y 18 se producen generalmente en un estadio posterior a la que implica el cromosoma 5, la suma de cambios es más importante que el orden en que se producen.

cer paso hacia la malignidad requiere la pérdida de función de los dos alelos del gen *DCC* (delecionado en el cáncer de colon). Se cree que el producto del gen *DCC* está implicado en la adhesión y la diferenciación celular. La mutación de los dos alelos DCC provoca la formación de adenomas de estado tardío, con protuberancias en forma de dedo (villi). Para que los adenomas tardíos progresen hasta adenomas cancerosos, deben sufrir la pérdida de la función de los genes *p53*. Como se ha discutido anteriormente en este capítulo, el producto génico p53 es esencial para detener el ciclo celular en respuesta a daños en el DNA, y la pérdida de p53 tiene por consecuencia un incremento importante de la tasa de mutación en todo el genoma. Los pasos finales hacia la malignidad implican mutaciones en un número desconocido de genes asociados a la metástasis (Figura 18.19).

Ahora resuelva esto

El Problema 18.7 de la página 525 le pide que explique por qué los fumadores de tabaco y algunas personas con mutaciones hereditarias en genes relacionados con el cáncer nunca desarrollan cáncer.

Sugerencia: Cuando considere las condiciones por las que el cáncer no es una consecuencia inevitable de las condiciones genéticas o ambientales, debería pensar en la característica de múltiples pasos del desarrollo del cáncer y en el tipo de funciones controladas genéticamente que son anormales en las células cancerosas. También le puede ser útil considerar cómo puede afectar el fondo genético de cada persona a las tasas de mutación y a las diferencias en las funciones de reparación del DNA.

18.7 Los virus contribuyen al cáncer tanto en humanos como en los otros animales

Los virus que provocan cáncer en los animales han desempeñado una función importante en la búsqueda del conocimiento sobre la genética del cáncer en humanos. Muchos de estos virus animales son virus de RNA conocidos como **retrovirus**. Puesto que estos virus transforman células en células cancerosas, se conocen como retrovirus de transformación aguda. En 1910, Francis Peyton Rous descubrió el primero de estos **virus de transformación aguda**. Rous estaba estudiando sarcomas (tumores sólidos de músculo, hueso o grasa) en pollos, y observó que los extractos de estos tumores causaban la formación de nuevos sarcomas cuando se inyectaban en pollos sin sarcomas. Varias décadas más tarde se identificó el agente del extracto que causaba los sarcomas, un retrovirus, y se denominó **virus del sarcoma de Rous** (**RSV**). En 1966, Rous recibió el Premio Nobel de fisiología y medicina por su trabajo, que estableció la relación entre virus y cáncer.

Para entender cómo los retrovirus causan cáncer en animales, es necesario conocer como se replican estos virus en las células. Cuando un retrovirus infecta una célula, la enzima **retrotranscriptasa**, que es traída a la célula por el propio virus que causa la infección, copia su genoma de RNA en una molécula de DNA. Entonces la copia de DNA entra en el núcleo de la célula infectada, donde se integra al azar en el genoma de la célula huésped. La copia de DNA integrada del RNA retrovírico se denomina **provirus**. El DNA provírico contiene unos potentes elementos promotores e intensificadores en las secuencias U5 y U3 en los extremos del provirus (Figura 18.20). El promotor U5 utiliza las proteínas de transcripción de la célula huésped para dirigir la transcripción de los genes víricos (*gag*, *pol* y *env*). Los productos de estos genes son las proteínas y los genomas de RNA que forman las nuevas partículas retrovíricas. Puesto que el retrovirus está integrado en el genoma del huésped, se replica con el DNA del huésped durante el ciclo celular normal. Puede que los retrovirus no maten la célula, pero muchos pueden continuar utilizando la célula como fábrica para replicar más virus, que luego infectarán las células vecinas.

Un retrovirus puede provocar cáncer de dos maneras diferentes. Primero, el DNA provírico se puede integrar por casualidad cerca de uno de los protooncogenes normales de la célula. Entonces, los poderosos promotores e intensificadores del provirus estimularán cantidades más altas de transcripción del protooncogén, o lo harán en un momento inadecuado, lo que con-

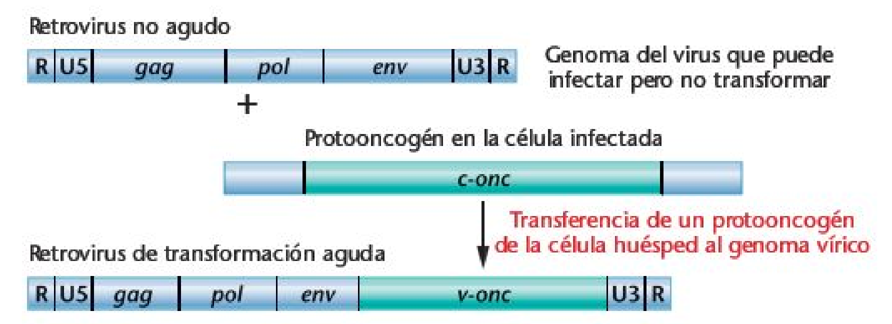


FIGURA 18.20 Genoma de un retrovirus típico, en la parte superior del esquema. El genoma contiene repeticiones en los extremos (R), las regiones U5 y U3 que contienen los elementos promotores e intensificadores, y los tres genes principales que codifican las proteínas estructurales del virus (*gag* y *env*) y la retrotranscriptasa (*pol*). Los nuevos genomas víricos comprenden los transcritos de RNA de todo su genoma. Si el retrovirus adquiere todo o parte de un protooncogén (*c-onc*) de la célula huésped, este gen (que pasa a conocerse como *v-onc*) se expresa junto con los genes víricos, lo que conduce a la sobreexpresión o a la expresión inadecuada del gen *v-onc*. El gen *v-onc* también puede adquirir mutaciones que incrementen su capacidad transformante.

duce a la estimulación de la proliferación de la célula huésped. Segundo, un retrovirus puede coger una copia de un protooncogén del huésped e integrarla en su genoma (Figura 18.20). El nuevo oncogén vírico puede mutar durante el proceso de transferencia al virus, o puede expresarse en cantidades anormales puesto que se encuentra bajo el control de un promotor vírico. Un oncogén transportado por un retrovirus se denomina *v-onc*; la versión celular normal de ese gen se denomina *c-onc*. Los retrovirus que transportan estos genes *v-onc* pueden infectar células normales y transformarlas en células tumorales. En el caso de RSV, el oncogén que había sido capturado del genoma del pollo era el gen *c-src*. Mediante el estudio de muchos virus de transformación aguda de animales, los científicos han identificado docenas de protooncogenes. En la Tabla 18.4 se enumeran algunos de ellos. Los oncogenes de los que proceden los *v-onc* pueden provocar cáncer mediante otros mecanismos además de estando presentes como genes *v-onc* en los retrovirus, como por mutación o expresión anormal, como se describió anteriormente en este capítulo. Del mismo modo, los científicos han identificado muchos protooncogenes mediante la clonación y la caracterización de genes que se expresan de manera anormal como resultado de la integración de un retrovirus.

Hasta la fecha, en humanos no se ha identificado ningún retrovirus de transformación aguda. Sin embargo, los virus de RNA y de DNA contribuyen al desarrollo de cánceres humanos de diversas maneras. Se cree que, a nivel mundial, el 15 por ciento de los cánceres está asociado a virus, lo que convierte a las infecciones víricas en el segundo factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer, después de fumar tabaco.

Los virus que más contribuyen al desarrollo de cánceres son los papillomavirus (HPV 16 y 18), el virus de la leucemia humana (HTLV-1), el virus de la hepatitis B, y el virus de Epstein-Barr (Tabla 18.5). Como sucede con otros factores de riesgo para el cáncer, incluyendo la predisposición hereditaria a determinados tipos de cáncer, la infección vírica por sí misma no es suficiente para iniciar un cáncer humano. Para que la célula entre en el camino de múltiples pasos que conduce al cáncer son necesarios otros factores, como daño en el DNA o la acumulación de mutaciones en uno o en más de un oncogén o gen supresor de tumores de la célula.

Puesto que los virus están formados únicamente por un genoma de ácido nucleico y una cubierta proteínica, deben utilizar la maquinaria biosintética de la célula para reproducirse. Ya que la mayoría de virus necesitan que la célula huésped esté en

TABLA 18.4 **ONCOGENES VÍRICOS REPRESENTATIVOS**

Oncogén	Origen	Especie	Función celular
v-abl	Virus de la leucemia murina de Abelson	Ratón	Tirosina quinasa
v-erbB	Virus de la eritroblastosis aviar	Pollo	Receptor de EGF
v-fos	Virus del osteosarcoma de FBJ	Ratón	Factor de transcripción
v-myc	Virus de la mielocitomatosis aviar	Pollo	Factor de transcripción
v-Ha-ras	Virus del sarcoma murino de Harvey	Ratón	Proteína de unión a GTP
v-sis	Virus del sarcoma de simios	Mono	Factor de crecimiento procedente de plaquetas
v-src	Virus del sarcoma de Rous	Pollo	Proteína de señalización tirosina quinasa

TABLA 18.5 VIRUS HUMANOS ASOCIADOS AL CÁNCER

Virus	Cáncer	Oncogenes	Mecanismo
Papillomavirus humano 16 y 18	Cáncer cervical	*E6, E7*	Inhibe los supresores de tumores p53 y pRB
Virus de la hepatitis B	Cáncer de hígado	*HBx*	Transducción de señales, estimula el ciclo celular
Virus de *Epstein–Barr*	Linfoma de Burkitt, cáncer nasofaríngeo	Desconocido	Desconocido
Herpesvirus 8 humano	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA	Varias posibilidades	Desconocido
Virus de la leucemia de células T humano	Leucemia de células T adultas	*pX*	Estimula el ciclo celular

un estado de crecimiento activo para acceder a sus enzimas de síntesis de DNA, a menudo estos virus contienen genes que codifican productos que estimulan el ciclo celular. Si el virus no mata a la célula huésped, puede producirse una pérdida del control del ciclo celular, lo que iniciaría la tumorigénesis.

Se cree que HPV 16 y HPV18 contribuyen al desarrollo de algunos cánceres anogenitales, especialmente cáncer cervical (Figura 18.21). Hasta el 90 por ciento de cánceres cervicales contienen DNA de HPV; sin embargo, solo una pequeña fracción de mujeres infectadas con HPV desarrollan cáncer cervical, y las que lo desarrollan es tras un largo período de latencia. HPV 16 y 18 codifican dos genes, *E6* y *E7*, que pueden ser considerados oncogenes codificados por virus. La proteína E6 se une a la proteína célula p53, lo que la inactiva. Como se ha discutido anteriormente, la proteína p53 es un componente esencial de los puntos de control del ciclo celular, y la pérdida de la proteína p53 conduce a inestabilidad genética. E6 también puede inactivar la apoptosis mediante la interacción con una proteína apoptótica denominada BAK. La proteína E7 se une a la proteína pRB celular, lo que provoca que pRB libere el factor de transcripción E2F, que a su vez inicia la expresión de genes cuyos productos están implicados en la replicación del DNA. E7 también puede estimular la progresión de la fase S mediante la activación de las ciclinas A y E, y bloqueando las proteínas inhibidoras de CDK.

El retrovirus HTLV-1 también contiene genes que estimulan la proliferación celular, lo que conduce al desarrollo de leucemia de células T en adultos. La infección de HTLV-1 es una epidemia mundial, que afecta a más de 20 millones de personas. Aproximadamente en el 5 por ciento de estos casos, esta infección vírica puede conducir a la leucemia, tras largos períodos de latencia. La mayor parte de la capacidad transformante de HTLV-1 es debida al producto de su gen *pX*, denominado proteína Tax. Tax es esencial para la replicación de HTLV-1, y es capaz de transformar independientemente células en cultivo e inducir tumores en ratones transgénicos que expresan la proteína. Tax actúa de factor de transcripción, uniéndose a la región promotora del virus y estimulando la transcripción del genoma vírico. Además, Tax estimula la transcripción de diversos genes celulares, entre los que se incluyen los protooncogenes *c-fos* y *c-jun*, genes de factores de crecimiento y genes de receptores de factores de crecimiento. Esto conduce a la estimulación de las células quiescentes para que entren en el ciclo celular. Además, Tax reprime la transcripción de algunos genes supresores de tumores, como el gen *p181NK4c*. Este gen supresor de tumores codifica una proteína que en condiciones normales inhibe CDK4 y detiene le ciclo celular en G1. Al reprimir la transcripción de *p181NK4c*, Tax incrementa la actividad de CDK4, lo que conduce a la fosforilación de pRB, a la liberación de E2F, y a la expresión de los genes requeridos para la transición de la fase G1 a la fase S. De esta manera, Tax ayuda a conducir la célula a través del ciclo celular. Además de sus efectos transcripcionales, Tax también inhibe la actividad de p53, lo que conduce a la abolición de los puntos de control del ciclo celular y al incremento de la tasa de mutación.



FIGURA 18.21 Micrografía electrónica coloreada de un grupo de papillomavirus humanos (HPV). Estos virus de DNA causan verrugas en las manos, en los pies y en las membranas mucosas. Los HPV 16 y 18 están implicados en el desarrollo de cáncer cervical.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que algunos virus contienen genes que contribuyen al desarrollo del cáncer?

18.8 Agentes ambientales que contribuyen a los cánceres humanos

Cualquier sustancia o suceso que dañe el DNA tiene el potencial de ser carcinogénico. Un DNA no reparado o mal reparado introduce mutaciones que, si se producen en un protooncogén o en un gen supresor de tumores, pueden conducir a la pérdida de regulación del ciclo celular o a la alteración de los controles de los contactos celulares y la invasión.

El ambiente, tanto el natural como el modificado por los humanos, contiene abundantes carcinógenos, como productos químicos, radiaciones, algunos virus e infecciones crónicas. Seguramente el carcinógeno más importante de nuestro ambiente es el humo del tabaco. Los epidemiólogos estiman que aproximadamente el 30 por ciento de muertes por cáncer en humanos están asociadas a fumar cigarrillos. El humo del tabaco contiene diversos productos que causan cáncer, algunos de los cuales mutan preferentemente protooncogenes como *ras* y genes supresores de tumores como *p53*.

A menudo la dieta está implicada en el desarrollo de cáncer. La ingestión de carne roja y grasa animal se asocia a algunos cánceres, como el de colon, el de próstata y el de mama. Los mecanismos por los que estas sustancias pueden contribuir a la carcinogénesis no están claros, pero pueden implicar la estimulación de la división celular mediada por hormonas, o la generación de productos carcinogénicos durante la cocción. El alcohol puede causar la inflamación del hígado y contribuir al cáncer de hígado.

Aunque la mayor parte de las personas perciben el ambiente industrial como un contribuyente importante al cáncer, podría justificar sólo un pequeño porcentaje de todos los cánceres, y a menudo sólo en situaciones muy especiales. Algunos de los agentes más mutagénicos, y por eso los potencialmente más carcinogénicos, son sustancias y procesos naturales. Por ejemplo, la aflatoxina, un componente del moho que crece en los cacahuetes y el maíz, es uno de los productos más carcinogénicos conocidos. La mayoría de los productos carcinogénicos pertenecen a las clases de los agentes alquilantes, aralquilantes y arilhidroxilaminas, que reaccionan con el DNA. Aunque algunas de estas sustancias, como las nitrosaminas son componentes de sustancias producidas por los humanos, muchas son de origen natural. Por ejemplo, los pesticidas naturales y los antibióticos de las plantas pueden ser carcinogénicos, y el propio cuerpo humano produce agentes alquilantes en el ambiente ácido del intestino. No obstante, estas observaciones no disminuyen el serio riesgo de cáncer de poblaciones específicas que están expuestas a carcinógenos de origen humano, como los pesticidas sintéticos y el amianto.

La lesiones del DNA producidas por las radiaciones naturales (rayos X y luz ultravioleta), por las sustancias naturales de la dieta y por el ambiente externo contribuyen a la mayoría de mutaciones causadas por el ambiente que conducen al cáncer. El metabolismo normal genera productos finales oxidantes que pueden dañar el DNA, las proteínas y los lípidos. Se estima que el cuerpo humano sufre unas 10.000 lesiones que dañan el DNA cada día, debido a la acción de los radicales de oxígeno libres. Las enzimas de reparación del DNA reparan eficazmente la mayoría de este daño; sin embargo, algunos de estos daños pueden conducir a mutaciones permanentes. El propio proceso de replicación del DNA es mutagénico. Por eso, sustancias como los factores de crecimiento y las hormonas que estimulan la división celular son, en última instancia, mutagénicos y quizás carcinogénicos. La inflamación crónica debida a una infección también estimula la reparación tisular y la división celular, lo que resulta en la acumulación de lesiones en el DNA durante su replicación. Estas mutaciones pueden persistir, especialmente si los puntos de control del ciclo celular están afectados debido a mutaciones o a inactivación de genes supresores de tumores como *p53* y *RB1*.

Tanto la luz ultravioleta (UV) como la radiación ionizante (como los rayos X y gamma) inducen daños en el DNA. (Véase el Capítulo 15.) Se ha establecido sin lugar a dudas que el daño producido por la luz UV solar es un inductor del cáncer de piel. Se ha demostrado claramente que la radiación ionizante es un carcinógeno, en estudios de poblaciones expuestas a los neutrones y a la radiación gamma procedentes de las bombas atómicas lanzadas sobre Hiroshima y Nagasaki. Otro componente ambiental importante, el gas radón, puede ser el responsable de hasta el 50 por ciento de la exposición a radiación ionizante de la población de los EEUU, y podría contribuir al cáncer de pulmón en algunas poblaciones.

Ahora resuelva esto

El Problema 18.16 de la página 525 le pide que evalúe que porcentaje de dinero gastado en investigaciones sobre el cáncer debería dedicarse a la investigación y a la educación de cómo prevenir el cáncer, y qué porcentaje debería dedicarse a la investigación de tratamientos contra esta enfermedad.

Sugerencia: Al responder a esta pregunta, piense en las tasas relativas de cánceres inducidos por el ambiente y de cánceres espontáneos. En segundo lugar, considere la proproción de cánceres inducidos por el ambiente que son debidos a la elección del estilo de vida. (Puede encontrar una fuente interesante de información sobre este tema en Ames, B.N. et al. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5258-65.)



Genética, tecnología y sociedad

Cáncer de mama: el doble filo de las pruebas genéticas

Son tiempos magníficos para la genética y la biotecnología. Terminado ya el Proyecto Genoma Humano ha surgido un gran optimismo sobre las aplicaciones futuras de la genética. Los científicos y los medios de comunicación predicen que las tecnologías genéticas podrán diagnosticar y curar pronto enfermedades como la diabetes, el asma, los ataques de corazón y la enfermedad de Parkinson.

La perspectiva de utilizar la genética para prevenir y curar un amplio espectro de enfermedades es emocionante. Sin embargo, en nuestro entusiasmo, a menudo olvidamos que estas nuevas tecnologías tienen limitaciones importantes y profundas implicaciones éticas. La historia de las pruebas genéticas para el cáncer de mama ilustra cómo debemos moderar nuestras altas expectativas con respecto a las incertidumbres.

El cáncer de mama es la forma más común de cáncer en mujeres, y la segunda causa de muerte debida al cáncer (detrás del cáncer de pulmón). Cada año, en los Estados Unidos, se diagnostican más de 190.000 casos nuevos. El cáncer de mama no está restringido a las mujeres; cada año se diagnostican unos 1.400 hombres con esta enfermedad. El riesgo de que una mujer desarrolle cáncer de mama en algún momento de su vida es del 12 por ciento, y este riesgo aumenta con la edad.

Aproximadamente entre el 5 y el 10 por ciento de casos de cáncer de mama son familiares, definidos por la aparición de diversos casos de cáncer de mama o de ovario entre parientes cercanos y por la temprana edad de manifestación. En 1994 se identificaron dos genes que muestran un ligamiento con los cánceres de mama familiares. La mutación germinal de estos genes (*BRCA1* y *BRCA2*) se encuentra asociada a la mayor parte de cánceres de mama familiares. Se desconocen las funciones moleculares de estos genes, aunque parecen estar implicados en la reparación del DNA dañado. Las mujeres que llevan una mutación en *BRCA1* o en *BRCA2* tienen un riesgo del 36 al 85 por ciento de desarrollar cáncer de mama durante su vida, y entre un 16 y un 60 por ciento de riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Los hombres con mutaciones germinales en *BRCA2* tienen un 6 por ciento de riesgo de padecer cáncer de mama durante su vida, lo que representa un incremento de 100 veces más riesgo que la población general de hombres.

Las pruebas genéticas de *BRCA1* y *BRCA2* detectan las 2.000 mutaciones diferentes que se sabe que se producen en la región codificante de estos genes, pero estas pruebas tienen sus limitaciones. No detectan mutaciones en las regiones reguladoras fuera de la región codificante, mutaciones que pueden causar la expresión aberrante de estos genes. También se desconoce cómo se manifiesta una mutación particular en términos de riesgo a padecer cáncer, y los factores ambientales y las interacciones con otros genes de susceptibilidad pueden modificar los efectos de cada mutación.

Muchas personas que pertenecen al grupo de riesgo de cáncer de mama optan por una prueba genética. Estas pacientes piensan que los resultados de la prueba les ayudarán a prevenir el cáncer de mama y de ovario, los ayudarán a tomar decisiones sobre paternidad responsable y les permitirá informar a los miembros de su familia que también puedan encontrarse en situación de riesgo. Pero ninguno de estos beneficios está completamente bien definido.

Una mujer cuya prueba de *BRCA* sea negativa puede sentirse aliviada y pensar que no tiene ningún riesgo de padecer cáncer de mama familiar. Sin embargo, el riesgo de esta persona de desarrollar cáncer de mama sigue siendo del 12 por ciento (el riesgo general de la población), y debe continuar haciendo un seguimiento del posible desarrollo de esta enfermedad. Además, un resultado negativo para esta prueba genética no elimina la posibilidad de que contenga una mutación hereditaria en otro gen que también incremente el riesgo de cáncer de mama, o que los genes *BRCA1* o *BRCA2* en regiones que sean inaccesibles a las pruebas genéticas actuales.

Si los resultados de la prueba son positivos, la mujer se encara a una elección difícil. Las opciones de tratamiento son escasas, y se basan en un seguimiento periódico, en una masectomía y/o una ooferoctomía (extirpación de las mamas y los ovarios, respectivamente) profilácticas, y en la ingesta de medicamentos como tamoxifen. La intervención quirúrgica profiláctica reduce el riesgo, pero no lo elimina, ya que todavía se puede producir cáncer en los tejidos que quedan. Los medicamentos como el tamoxifen también reducen el riesgo, pero tienen importantes efectos secundarios. Las pruebas genéticas no afectan sólo a la paciente, sino también a toda su familia. A menudo las personas tienen miedo, padecen ansiedad o manifiestan sentimientos de culpabilidad al saber que son portadores de una enfermedad genética. Los estudios muestran que a menudo las personas que rechazan la prueba genética padecen más ansiedad que las que optan por conocer el resultado. Los pacientes temen que los resultados de la prueba genética puedan ser tenidos en cuenta por las compañías aseguradoras y en el trabajo, poniendo en peligro sus perspectivas laborales y las prestaciones de las compañías aseguradoras de salud y de vida. Un estudio muestra que una cuarta parte de las personas elegibles rechazan la prueba de BRCA por sus inquietudes sobre el coste, la confidencialidad y la discriminación potencial.

El desarrollo de las pruebas genéticas es muy reciente, y el sistema sanitario va retrasado respecto a la ciencia. Puesto que las pruebas genéticas presentan ambigüedades psicológicas y médicas, es necesario el consejo genético para los pacientes y sus familias. Sin embargo, el número de consejeros genéticos con experiencia en pruebas genéticas es insuficiente, e incluso para los más cualificados, estos temas son complejos y difíciles. A menudo el conocimiento de los médicos sobre la genética clínica humana es limitado, y creen que no es adecuado aconsejar a los pacientes. El gobierno federal y las industrias aseguradoras tienen que desarrollar una política coherente sobre las pruebas genéticas y la información genética. Dadas las interpretaciones imprecisas de las pruebas genéticas de *BRCA*, las

relativamente poco eficientes opciones de tratamiento, y los potenciales efectos colaterales psicológicos y sociales, no es sorprendente que sólo el 60 por ciento de los pacientes de cáncer de mama familiar deciden someterse a las pruebas genéticas.

Todavía hay muchas preguntas importantes sin respuesta sobre las pruebas genéticas de *BRCA1* y *BRCA2*. ¿Qué riesgo de desarrollar cáncer presentan las distintas mutaciones? ¿Todas las personas deben tener acceso a las pruebas de *BRCA*, o sólo las que se encuentran en el grupo de alto riesgo? ¿Cómo podemos asegurarnos de que los altos costes de las pruebas genéticas y del consejo genético no limiten esta nueva tecnología a una pequeña parte de la población? En las próximas décadas, a medida que se vayan desarrollando cada vez más pruebas para enfermedades genéticas, la preocupación por estos temas continuará aumentando.

Bibliografía

Surbone, A. 2001. Ethical implications of genetic testing for breast cancer susceptibility. *Crit. Rev. in Onc./Hem*. 40:149–57.

Páginas Web

Prueba genética para *BRCA1* y *BRCA2*: es tu elección *[on line]*. Instituto Nacional de Salud. *http://cis.nci.nih.gov/fact/3_62.htm*

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. El cáncer es una enfermedad genética, predominantemente de las células somáticas. Aproximadamente el 1 por ciento de los cánceres están asociados a mutaciones en la línea germinal, lo que incrementa la susceptibilidad a determinados cánceres.
2. Las células cancerosas tienen dos propiedades básicas: proliferación celular anormal y propensión a propagarse y a invadir otras partes del cuerpo (metástasis). Los genes que controlan estos aspectos de la función celular se encuentran mutados o se expresan de manera inadecuada en las células cancerosas.
3. Los cánceres son clonales, lo que significa que todas las células de un tumor se han originado a partir de una única célula que contiene diversas mutaciones.
4. El desarrollo de un cáncer es un proceso con múltiples pasos, y precisa mutaciones en diversos genes relacionados con el cáncer.
5. Las células cancerosas muestran una alta tasa de mutación, anormalidades cromosómicas y estabilidad genómica. Esto conduce a la acumulación de mutaciones en genes específicos que controlan aspectos de la proliferación celular, la apoptosis y los contactos célula-célula.
6. Las células cancerosas presentan defectos en la regulación de la progresión del ciclo celular, en los puntos de control del ciclo celular y en las rutas de transducción de señales.
7. Los protooncogenes son genes normales que promueven el crecimiento y la división celular. Cuando los protooncogenes están mutados o se expresan erróneamente en las células cancerosas, se denominan oncogenes.
8. Normalmente, los genes supresores de tumores regulan los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis. Cuando los genes supresores de tumores están mutados o inactivados, las células no pueden corregir los daños de su DNA. Esto conduce a la acumulación de mutaciones que pueden provocar cáncer.
9. Las mutaciones hereditarias en los genes de susceptibilidad al cáncer no son suficientes para iniciar un cáncer. Para que se inicie la tumorigénesis es necesario que se produzca una segunda mutación somática en la otra copia del gen. Además, para que se desarrollen los cánceres hereditarios es necesario que se produzcan mutaciones en otros genes relacionados con el cáncer.
10. Los virus tumorales de RNA y de DNA contribuyen al cáncer estimulando la proliferación celular. Para ello introducen nuevos oncogenes, interfieren con los productos celulares normales de los genes supresores de tumores o estimulan la expresión de protooncogenes celulares.
11. Agentes ambientales como productos químicos, radiaciones, virus e infecciones crónicas contribuyen al desarrollo de cáncer. Los agentes ambientales más importantes que afectan los cánceres humanos son el humo del tabaco, la dieta y las radiaciones naturales.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. En enfermedades como el retinoblastoma, se puede heredar de la línea germinal una mutación en un alelo del gen *RB1*, lo que causa una predisposición autosómica dominante a desarrollar un tumor ocular. Para desarrollar el tumor, es necesario que se produzca una mutación somática en la segunda copia del gen *RB1*, lo que indica que la mutación actúa como un carácter recesivo. Dado que la primera mutación puede ser hereditaria, ¿de qué maneras se puede producir una segunda mutación?

Solución: Al considerar cómo puede surgir esta segunda mutación, debemos mirar diferentes tipos de sucesos mutacionales, incluyendo cambios en la secuencia nucleotídica y sucesos que implican a cromosomas enteros o partes de cromosomas. El retinoblastoma se produce cuando se pierden o se inactivan ambas copias del locus *RB1*. Teniendo esto presente, primero debe enumerar los fenómenos que pueden resultar en la pérdida o inactivación mutacional de un gen.

Una forma de que aparezca una segunda mutación en *RB1* es por alteración de un nucleótido que convierta el alelo *RB1* normal que queda en una forma mutante. Esta alteración puede ocurrir por la sustitución de un nucleótido o por una mutación de cambio de fase de lectura causada por la inserción o la deleción de nucleótidos durante la replicación. Un segundo mecanismo implica la pérdida del cromosoma que lleva el alelo normal. Este suceso se produciría durante la mitosis, y el resultado sería la monosomía del cromosoma 13, lo que dejaría la copia mutante del gen como el único alelo *RB1*. Este mecanismo no implica necesariamente la pérdida de todo el cromosoma; la deleción del brazo largo (*RB1* se encuentra en 13q) o una deleción interna que afectase al locus *RB1* y parte del material adyacente tendría el mismo resultado. Alternativamente, una aberración cromosómica que implicase la pérdida de la copia normal del gen *RB1* podría ser seguida por la duplicación del cromosoma que lleva el alelo mutante. En la célula se restaurarían dos copias del cromosoma 13, pero el alelo *RB1* normal no estaría presente. Finalmente, un suceso de recombinación seguido de la segregación de los cromosomas podría producir una combinación homocigota de alelos mutantes *RB1*.

2. Los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes de diferentes maneras. En algunos casos, el propio protooncogén se amplifica hasta cientos de veces en una célula cancerosa. Este es el caso del gen *ciclina D1,* que se amplifica en algunos cánceres. En otros casos, el protooncogén puede mutar de diversas maneras concretas, lo que conduce a la alteración de la estructura del producto génico. El gen *ras* es un ejemplo de protooncogén que se convierte en oncogénico tras sufrir mutaciones puntuales en regiones específicas de su secuencia. Explique por qué estos dos protooncogenes (*ciclina D1* y *ras*) experimentan alteraciones tan diferentes para convertirse en oncogenes.

Solución: El primer paso para resolver esta pregunta es entender las funciones normales de estos protooncogenes, y pensar cómo la amplificación o la mutación afectarían cada una de estas funciones.

La proteína ciclina D1 regula la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S, uniéndose a CDK4 y activando esta quinasa. El complejo ciclina D1/CDK4 fosforila diversas proteína, incluyendo pRB, que a su vez activa otras proteínas en una cascada cuyo resultado es la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para la síntesis de DNA en la fase S. La manera más sencilla de incrementar la actividad de la ciclina D1 sería incrementar el número de moléculas ciclina D1 disponibles para unirse a las moléculas CDK4, que son endógenas de la célula. Esto puede lograrse mediante diversos mecanismos, incluyendo la amplificación del gen *ciclina D1*. Lo más probable es que una mutación puntual en este gen interfiriese con la capacidad de la proteína ciclina D1 de unirse a CDK4; por eso, las mutaciones en este gen probablemente reprimirían la progresión del ciclo celular en vez de estimularlo.

El producto del gen *ras* es una proteína de transducción de señal que opera como un interruptor de conexión y desconexión en respuesta a la estimulación eterna de factores de crecimiento. Esto lo realiza uniéndose a GTP (conectado) o a GDP (desconectado). Las mutaciones oncogénicas en el gen *ras* ocurren en regiones específicas que alteran la capacidad de la proteína Ras de intercambiar GTP por GDP. Las proteínas Ras oncogénicas se encuentran en la conformación de conexión, unidas a GTP. De esta manera, estimulan constantemente a la célula para que se divida. Una amplificación del gen *ras* simplemente proporcionaría más moléculas de la proteína Ras normal, que continuaría siendo capaz de regular la conexión y la desconexión. Por eso, es menos probable que la amplificación de ras fuese oncogénica.

3. Explique por qué muchos virus oncogénicos contienen genes cuyos productos interaccionan con proteínas supresoras de tumores.

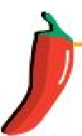
Solución: Para responder a esta pregunta, es útil considerar lo que los virus intentan lograr en las células, y cuales son las funciones de los supresores de tumores en las células normales.

El objetivo de los virus oncogénicos no es causar cáncer, sino maximizar el potencial de replicación vírica. Los virus son entidades relativamente sencillas, que consisten únicamente en un genoma de ácido nucleico, un DNA o un RNA, y un número relativamente pequeño de proteínas estructurales y enzimáticas. Dependen de sus células huésped para obtener la mayor parte de la maquinaria biosintética y de los componentes estructurales necesarios para replicar sus genomas y ensamblar nuevas partículas víricas. Por ejemplo, muchos virus requieren la RNA polimerasa II, los factores de transcripción y los precursores ribonucleotídicos de la célula huésped para transcribir sus genomas víricos. También requieren componentes de la maquinaria de replicación del DNA de la célula huésped para replicar los genomas víricos. Por eso, la célula huésped ideal para una infección vírica es la que se encuentra dentro del ciclo celular, con preferencia al final de la fase G1 o al inicio de la fase S.

En los eucariotas superiores, como los humanos, la mayor parte de células son quiescentes (en fase G0). Para estimular la célula infectada para que entre en el ciclo celular y priorice la replicación del DNA, muchos virus contienen genes que codifican proteínas que estimulan el crecimiento. Como se ha visto en este capítulo, las proteínas supresoras de tumores están implicadas en contener el ciclo celular en los puntos de control, o en iniciar el proceso de muerte celular programada. Ambas funciones inhiben los objetivos de un virus típico; por eso, muchos virus han desarrollado métodos para inactivar los supresores de tumores. Una de las maneras por las que las proteínas víricas pueden inactivar los supresores de tumores es uniéndose a ellos e inhibiendo sus funciones. Los supresores de tumores p53 y pRB son dianas comunes de las proteínas reguladoras víricas, como las proteínas E6 y E7 del HPV 16 y 18. Al inactivar los supresores de tumores, estos virus son capaces de mantener la célula dentro del ciclo celular. Para el huésped, sin embargo, esta estimulación del crecimiento en ausencia de los puntos de control del ciclo celular puede conducir a un incremento de la acumulación de mutaciones y a una posible tumorigénesis.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Como consejero genético, se le pide que compruebe el riesgo de una pareja que quiere tener niños, pero que tiene antecedentes familiares de retinoblastoma. En este caso, tanto el marido como la esposa son fenotípicamente normales, pero el marido tiene una hermana con retinoblastoma familiar en ambos ojos. ¿Cuál es la probabilidad de que esta pareja tenga un hijo con retinoblastoma? ¿Hay alguna prueba que se pudiera recomendar para ayudar en esta evaluación?
2. ¿Qué hechos ocurren en cada uno de los estadios del ciclo celular? ¿Qué estadio tiene una duración más variable?
3. ¿Dónde se encuentran los principales puntos reguladores del ciclo celular?
4. Haga una lista de las funciones de las quinasas y las ciclinas, y describa como interactúan entre sí para permitir el paso a través del ciclo celular.
5. (a) ¿Cómo funciona pRB para mantener las células en el punto de control de G1? (b) ¿Cómo pasan las células el punto de control de G1 para entrar en la fase S?
6. ¿Cuál es la diferencia entre decir que un cáncer es hereditario y decir que la predisposición al cáncer es hereditaria?
7. Aunque el humo del tabaco es responsable de un gran número de cánceres humanos, no todos los fumadores desarrollan cáncer. Describa algunas razones para esta observación.
8. ¿Qué es la apoptosis y bajo que circunstancias las células experimentan este proceso?
9. Defina los genes supresores de tumores. ¿Por qué se espera que la mayoría de genes supresores de tumores sean recesivos?
10. En el genoma del virus del sarcoma de Rous (RSV), un protooncogén de la célula huésped se convierte en un oncogén. ¿Cómo ocurre esta conversión?
11. Parte de la proteína Ras está asociada a la membrana plasmática, y parte se extiende hacia el citoplasma. ¿Cómo transmite la señal la proteína Ras desde el exterior de la célula hasta el citoplasma? ¿Qué pasa en el caso en que el gen *ras* está mutado?
12. Si una célula sufre daños en el DNA mientras está en la fase S, ¿cómo se puede reparar este daño antes de que la célula entre en mitosis?
13. Diferencia entre oncogenes y protooncogenes. ¿De qué manera se puede convertir un protooncogén en un oncogén?
14. De las dos clases de genes asociados al cáncer, los genes supresores de tumores y los oncogenes, ¿en qué grupo se puede considerar que las mutaciones son de ganancia de función? ¿En qué grupo son mutaciones de pérdida de función? Explíquelo.
15. ¿De qué manera una translocación, como la del cromosoma Filadelfia, contribuye al cáncer?
16. Dado que el ambiente puede inducir el cáncer, y que algunos factores ambientales son el resultado de la elección del tipo de vida, como fumar, tomar el sol y la dieta, ¿qué porcentaje de dinero que se gasta en la investigación del cáncer cree que se debería dedicar a la investigación y a la educación sobre la prevención del cáncer, en lugar de a encontrar su curación?
17. En la CML, las células sanguíneas leucémicas se pueden distinguir de las otras por la presencia de una proteína híbrida BCR-ABL funcional. Explique cómo esta característica proporciona una oportunidad para desarrollar una aproximación terapéutica para tratar la CML.
18. ¿Cómo se protegen las células de la acumulación de mutaciones en sus genes que pueden conducir al cáncer? ¿En qué se diferencian las células cancerosas de las normales respecto a estos procesos?
19. Describa la diferencia entre un virus de transformación aguda y un virus que no cause tumores.
20. Explique cómo los agentes ambientales como productos químicos y la radiación pueden causar cáncer.
21. La radioterapia (el tratamiento con radiaciones ionizantes) es uno de los tratamientos actuales más efectivos contra el cáncer. Actúa dañando el DNA y otros componentes celulares. ¿De qué manera la radioterapia puede controlar o curar el cáncer, y por qué a menudo la radioterapia tiene efectos colaterales importantes?
22. Suponga una mujer joven de quien se sospecha que pueda tener cáncer de mama familiar se somete a las pruebas genéticas de *BRCA1* y *BRCA2*, y los resultados son negativos. Es decir, el resultado de la prueba para los alelos mutantes *BRCA1* y *BRCA2* no es positivo. ¿Esta mujer puede considerarse libre de riesgo de padecer cáncer de mama?
23. Las personas que tienen la condición genética conocida como síndrome de Li-Fraumeni heredan una copia mutante del gen p53. Estas personas tienen un alto riesgo de desarrollar diversos tipos de cánceres diferentes, como cáncer de mama, leucemias, cánceres de hueso, tumores adrenocorticales y tumores cerebrales. Explique cómo mutaciones en un único gen relacionado con el cáncer puede generar una gama tan amplia de tumores.
24. Explique las diferencias entre tumor benigno y maligno.
25. Como miembro de un proyecto de investigación sobre el cáncer, ha descubierto un gen que se encuentra mutado en muchos tumores metastáticos. Después de determinar la secuencia de este gen, la compara con la de otros genes en la base de datos de secuencias del genoma humano. Su gen codifica una secuencia de aminoácidos que se parece a las encontradas en algunas serina proteasas. Especule sobre cómo podría contribuir su nuevo gen al desarrollo de cánceres altamente invasivos.



Problemas extra-picantes

26. Un estudio realizado por Bose y sus colaboradores (1998. *Blood* 92:3362-67) y un estudio anterior realizado por Biernaux y sus colaboradores (1996. *Bone Marrow Transplant* 17: (Suppl. 3) S54-S47) demostraron que el 25-30 por ciento de los adultos sanos que no desarrollan leucemia mielógena crónica (CLM) presentan transcritos del gen de fusión BCR-ABL. Explique cómo pueden llevar estas personas un gen de fusión que es transcripcionalmente activo y no desarrollar CML.

27. Aquellas personas que heredan un alelo mutante de gen *RB1* presentan riesgo de desarrollar un cáncer óseo denominado osteosarcoma. Sospecha que en estos casos el osteosarcoma requiere una mutación en el segundo alelo *RB1,* ha cultivado algunas células de osteosarcoma y ha obtenido un clon de cDNA normal para el gen humano *RB1.* Un compañero le envía un artículo en el que se presenta una cepa de ratones propensos a desarrollar tumores malignos cuando se les inyectan células de osteosarcoma, y usted obtiene estos ratones. Utilizando estos tres materiales, ¿qué experimentos realizaría para determinar (a) si las células de osteosarcoma llevan dos mutaciones *RB1,* (b) si las células del osteosarcoma producen alguna proteína pRB, y (c) si la adición de un gen *RB1* normal cambiará la potencialidad de las células de osteosarcoma de causar cáncer?

28. El compuesto benzo(a)pireno se encuentra en el humo de los cigarrillos. Este compuesto modifica químicamente a la base guanina del DNA. Tales bases modificadas se eliminan normalmente por una enzima que hidroliza la base dejando un lugar apurínico. Si no se repara tal lugar, se inserta preferencialmente una adenina en el lugar apurínico. En un estudio de pacientes de cáncer de pulmón (Harris A. 1991. *Nature* 350:377-78) las células tumorales de 15 de los 25 pacientes tenían una transversión de G a T en el gen p53, que tiene un papel conocido en la formación del cáncer. Se le pide que testifique como experto invitado en un caso judicial en que una viuda de un varón que murió de cáncer de pulmón está pleiteando contra R. J. Reynolds por vender productos de tabaco que mataron a su marido. ¿Qué le diría al jurado? (Sólo opinión científica; no exposiciones personales sobre los abogados o sobre el sistema legal.)

29. La Tabla 18.6 (p. 456) resume algunos de los datos recogidos de mutaciones *BRCA1* en familias con una alta incidencia de aparición temprana de cáncer de mama y de ovario familiar. La Tabla 18.7 muestra polimorfismos neutrales encontrados en familias control (cuya frecuencia de cáncer de mama y de ovario no está incrementada). (a) Observe el efecto en el código encontrado en el grupo de parientes 2083 de la Tabla 18.6, que resulta de una única sustitución de bases. Dibuje la secuencia de DNA de doble cadena normal de este codón (con los extremos 5' y 3' marcados), y muestre la secuencia de sucesos que generaron esta mutación, suponiendo que resultó de un emparejamiento erróneo no corregido durante la replicación del DNA. (b) Examine los tipos de mutaciones que se enumeran en la Tabla 18.6, y determine si es más probable que el gen *BRCA1* sea un gen supresor de tumores o un oncogén. (c) Aunque las mutaciones de la Tabla 18.6 son claramente perjudiciales y causan cáncer de mama en mujeres jóvenes, cada uno de los grupos tiene al menos una mujer que llevaba la mutación pero que vivió al menos hasta los 80 años sin desarrollar cáncer. Cite al menos dos mecanismos diferentes (o variables) que podrían subyacer a la variación de la expresión de un fenotipo mutante, y proponga una explicación para la penetrancia incompleta de esta mutación. ¿Cómo se correlacionan estos mecanismos o variables a esta explicación?

30. Examine la Tabla 18.7 (p. 456). (a) ¿Qué se entiende por polimorfismo neutro? (b) ¿Cuál es el significado de esta tabla en el contexto del examen de una familia o población de mutaciones *BRCA1* que predisponen a los individuos al cáncer? (c) ¿Es más probable que el polimorfismo PM2 se produzca por una mutación neutra sin sentido o por una mutación silenciosa? (d) Responda a la pregunta (c) para el polimorfismo PM3.

TABLA 18.6 MUTACIONES DE PREDISPOSICIÓN EN *BRCA1*

		Mutación		
Parentela	**Codón**	**Cambio nucleotídico**	**Efecto en el código**	**Frecuencia en los cromosomas control**
1901	24	−11 pb	Desplazamiento de la fase de lectura o empalme	0/180
2082	1313	C → T	Met → Parada	0/170
1910	1756	C extra	Desplazamiento de la fase de lectura	0/162
2099	1775	T → G	Met → Arg	0/120
2035	NA*	¿?	Pérdida del transcrito	NA*

Fuente: 1994. *Science* 266:66–71.

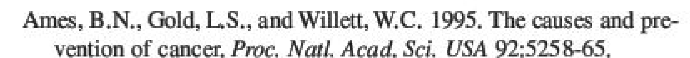
*NA significa no aplicable, ya que se deduce la mutación de regulación, y no se ha identificado su posición.

TABLA 18.7 **POLIMORFISMOS NEUTRALES EN *BRCA1***

Nombre	Localización del codón	Base del codón†	*Frecuencia en los cromosomas controles** A	C	G	T
PM1	317	2	152	0	10	0
PM6	878	2	0	55	0	100
PM7	1190	2	109	0	53	0
PM2	1443	3	0	115	0	58
PM3	1619	1	116	0	52	0

* Se muestra el número del cromosoma con la base concreta en el sitio polimórfico indicado (A, C, G y T).
† Posición 1, 2, ó 3 del codón.

LECTURAS SELECCIONADAS



Ames, B.N., Gold, L.S., and Willett, W.C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5258-65.

Bernards, R., and Weinberg, R.A. 2002. A progression puzzle. *Nature* 418:823.

Brown, M.A. 1997. Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv. Genet.* 36:45-135.

Cavenee, W.K., and White, R.L. 1995. The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* (Mar.) 272:72–79.

Compagni, A., and Christofori, G. 2000. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Brit. J. Cancer* 83:1-5.

Cornelis, J.F., et al. 1998. Metastasis. *Am. Scient.* 86:130-41.

Fearon, E.R. 1997. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278:1043-50.

Futreal, P.A., et al. 2004. A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* 4:177-83.

Hartwell, L.H., and Kastan, M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-27.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1997. Genetic instability in colorectal cancer. *Nature* 386:623-27.

Nurse, P. 1997. Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91:865-67.

Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-22.

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-77.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 9:138-41.

Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-30.

Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Sci. Am.* (Sept.) 275: 62-70.

Tecnología del DNA recombinante



Placa de Petri que muestra el crecimiento de células huésped tras incorporar plásmidos recombinantes.

Conceptos del capítulo

- La tecnología del DNA recombinante genera combinaciones artificiales de moléculas de DNA.
- La tecnología del DNA recombinante depende, en parte, de la capacidad de cortar y unir segmentos de DNA por secuencias específicas de bases.
- Las moléculas de DNA recombinante suelen estar formadas por DNA procedente de dos fuentes diferentes, la mayor parte de las veces de distintas especies.
- La aplicación más útil de la tecnología del DNA recombinante es clonar un segmento de DNA de interés.
- La clonación insiere segmentos específicos de DNA en vectores (como plásmidos), que son transferidos a células huésped (como células bacterianas), donde las moléculas recombinantes se replican al dividirse la célula huésped.
- Las moléculas recombinantes se pueden clonar en células huésped procariotas y eucariotas.
- Los segmentos de DNA se pueden amplificar millares de veces de manera rápida y eficiente utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Los segmentos de DNA clonados se caracterizan de diversas maneras, siendo la más específica la secuenciación del DNA.
- La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado la capacidad de investigar los genomas de las diversas especies.

En 1971, un artículo publicado por Kathleen Danna y Daniel Nathans marcó el inicio de la era del DNA recombinante. Este artículo describe el aislamiento de una enzima de una cepa bacteriana y la utilización de esta enzima para cortar DNA vírico por secuencias nucleotídicas específicas. Contiene la primera fotografía publicada de DNA cortado con una de estas proteínas, denominada enzima de restricción. Utilizando enzimas de restricción y otros recursos diversos, entre mediados y finales de la década de 1970 se desarrollaron técnicas para generar, replicar y analizar moléculas de DNA recombinante. Este conjunto de métodos, denominados tecnología del DNA recombinante, supusieron un progreso importante en la investigación, y permitieron a los científicos aislar y estudiar secuencias específicas de DNA. Por sus contribuciones al desarrollo de esta tecnología, en 1978 Nathans, Hamilton Smith y Werner Arber fueron galardonados con el premio Nobel de fisiología y medicina.

La tecnología del DNA recombinante permite la identificación y el aislamiento de genes concretos de entre los miles o decenas de millares de genes presentes en el genoma, y permite la producción de grandes cantidades de este gen en forma de moléculas clonadas de DNA. Además, el gen clonado puede ser transferido a células que sintetizarán el producto que codifica. Entonces se puede recuperar y purificar este producto para su uso en investigación, en medicina o en la industria.

Los clones son organismos, células o moléculas idénticos descendientes de un único antecesor. La clonación de un gen produce muchas copias idénticas que pueden usarse para numerosos propósitos, que incluyen desde la investigación de su estructura y organización hasta la producción comercial de la proteína que codifica. En este capítulo se exponen los métodos básicos de la tecnología del DNA recombinante que se utilizan para aislar, replicar y analizar los genes. En Capítulo 22 se discutirán algunas de las aplicaciones de esta tecnología en investigación, medicina, sistema legal, agricultura e industria.

19.1 La tecnología del DNA recombinante combina diversas técnicas experimentales

El término **DNA recombinante** hace referencia a la creación de nuevas combinaciones de segmentos o de moléculas de DNA que no se encuentran juntas de manera natural. Aunque el proceso genético de recombinación produce moléculas de DNA recombinante, el término *DNA recombinante* se reserva generalmente para las moléculas de DNA producidas por la unión de segmentos que provienen de diferentes fuentes biológicas.

La tecnología del DNA recombinante utiliza técnicas que provienen de la bioquímica de los ácidos nucleicos unidas a metodologías genéticas desarrolladas originalmente para la investigación de bacterias y de virus. Esta tecnología es una herramienta poderosa para producir cantidades potencialmente ilimitadas de un gen. Aunque se dispone de diversos métodos, los procedimientos básicos incluyen los siguientes pasos:

1. Se purifica el DNA a clonar de células o tejidos.
2. Para generar fragmentos específicos de DNA se utilizan unas proteínas denominadas **enzimas de restricción**. Estas enzimas reconocen y cortan las moléculas de DNA por secuencias nucleotídicas específicas.
3. Los fragmentos producidos mediante la digestión con enzimas de restricción se unen a otras moléculas de DNA que sirven de vectores. Un vector unido a un fragmento de DNA es una **molécula de DNA recombinante**.
4. La molécula de DNA recombinante se transfiere a una célula huésped. La molécula de DNA recombinante se replica dentro de esta célula, produciendo docenas de copias idénticas, o **clones**, de si misma.
5. Al replicarse las células huésped, las células descendientes heredan el DNA recombinante, generándose una población de células huésped que llevan todas ellas copias de la secuencia de DNA clonada.
6. El DNA clonado puede recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.
7. También se puede transcribir el DNA clonado, se puede traducir su mRNA, y el producto génico que codifica se puede aislar y usar en investigación, o se puede vender comercialmente.

19.2 La tecnología del DNA recombinante es la base fundamental del análisis genómico

La tecnología del DNA recombinante y la clonación de genes proporciona a los científicos métodos para aislar grandes cantidades de genes específicos o de otras secuencias de DNA a partir de genomas grandes y complejos. Por ejemplo, el genoma humano contiene más de tres mil millones de nucleótidos y unos 25.000 a 30.000 genes[1]. Las enzimas de restricción cortan el genoma en fragmentos más pequeños que se pueden manipular, separar, copiar y estudiar individualmente. Esto permite que los científicos investiguen muchos aspectos de la organización y la función génica, de los factores que regulan la expresión génica y de las características y las funciones de las proteínas codificadas. Empezaremos la discusión de esta tecnología considerando dos componentes importantes que se usan para construir las moléculas de DNA recombinante.

---

[1] *Nota del traductor:* el último recuento de genes contenidos en el genoma humano, realizado a principios de 2005 utilizando un programa de detección de pautas de lectura abiertas más preciso que los usados anteriormente, estima que el genoma humano contiene entre 20.000 y 24.000 genes.

19.3 Las enzimas de restricción cortan el DNA por secuencias de reconocimiento específicas

Las enzimas de restricción son producidas por las bacterias como un mecanismo de defensa contra las infecciones víricas. Se han identificado más de 200 enzimas de restricción, aproximadamente 100 de las cuales son usadas de manera rutinaria por los científicos. Todas las enzimas de restricción se unen al DNA (Figura 19.1) y reconocen una secuencia específica de nucleótidos, denominada **secuencia de reconocimiento**. La enzima corta ambas cadenas de DNA dentro de la secuencia de reconocimiento siguiendo un **patrón de corte** específico. La principal utilidad de las enzimas de restricción para la clonación procede de su capacidad de cortar el DNA genómico de manera precisa y reproducible en fragmentos denominados **fragmentos de restricción**. El tamaño de los fragmentos de restricción viene determinado por cuán a menudo una enzima de restricción determinada corte el DNA. Si todos los nucleótidos estuviesen presentes en las mismas proporciones, las enzimas que reconocen una secuencia de 4 nucleótidos, como *Alu I* (AGCT), harían un corte, en promedio, cada 256 pares de bases ($4^n = 4^4 = 256$), produciendo muchos fragmentos pequeños. Las enzimas como *NotI* reconocen una secuencia de ocho bases (GCGGCCGC), y en promedio cortan el DNA cada 65.500 pares de bases ($4^n = 4^8$), produciendo menos fragmentos pero más largos. El tamaño real de los fragmentos producidos al cortar el DNA con una determinada enzima de restricción es variable ya que el número y la localización de las secuencias de reconocimiento no están siempre distribuidos aleatoriamente en el DNA.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos si una enzima de restricción cortará el DNA a menudo o de manera poco frecuente si todas las bases estuviesen representadas por igual?

La mayoría de las secuencias de reconocimiento contienen un tipo de simetría en el que la secuencia nucleotídica se lee igual en ambas cadenas del DNA en dirección 5′-3′ (un **palíndromo**). Cada enzima de restricción se une al DNA en una secuencia de reconocimiento específica, y lo corta según un patrón de corte característico. Muchas enzimas de restricción cortan las cadenas de DNA de manera sesgada, produciendo fragmentos con colas de cadena sencilla protuberantes, o cortan ambas cadenas de manera simétrica en la secuencia de reconocimiento palindrómica, produciendo extremos romos. En la Figura 19.2 se muestran algunas enzimas de restricción y sus secuencias de reconocimiento.

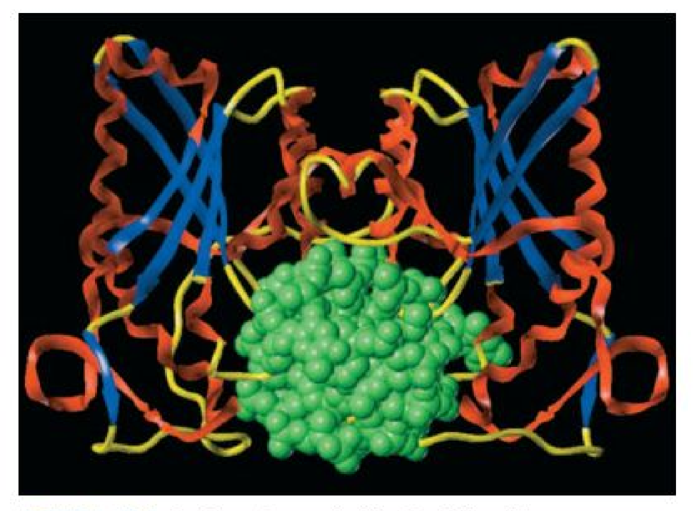


FIGURA 19.1 Enzima de restricción *Bam*H1 unido a una molécula de DNA (en verde). Las enzimas de restricción cortan el DNA en sitios específicos.

Una de las primeras enzimas de restricción identificadas fue aislada de la cepa R de *Escherichia coli*, y se denominó *Eco*RI (que se pronuncia eco-r-uno). En la Figura 19.3 se muestra su secuencia de reconocimiento de seis nucleótidos y el patrón de corte. Los fragmentos de DNA producidos por digestión con *Eco*RI tienen colas protuberantes de cadena sencilla («extremos cohesivos o pegajosos») que pueden formar puentes de hidrógeno con colas complementarias de cadena sencilla de fragmentos de DNA que provengan de cualquier otra fuente. Si se mezclan en las condiciones adecuadas, los fragmentos de DNA de dos fuentes diferentes forman moléculas recombinantes por la unión mediante puentes de hidrógeno de sus extremos cohesivos. La enzima **DNA ligasa** puede unir covalentemente los fragmentos para formar una molécula de DNA recombinante (Figura 19.4).

19.4 Los vectores transportan las moléculas de DNA a clonar

Los fragmentos de restricción de DNA no pueden entrar directamente en las células huésped para ser copiados. Sin embargo, cuando se une un fragmento de restricción a otra molécula de DNA denominada vector, puede entrar en una célula huésped, donde se puede replicar o clonar en muchas copias. En esencia, los vectores son moléculas transportadoras de DNA que transfieren y replican (clonan) fragmentos de DNA insertados. Se dispone de muchos vectores de clonación, que difieren en la especificidad de la célula huésped, el tamaño de los insertos que pueden transportar y en otras características, como el número de copias que producen, el número de secuencias de reconocimiento disponibles para la clonación y el número y el tipo de genes marcadores.

Para que sirva de vector, una molécula de DNA debe ser capaz de replicarse independientemente junto con el fragmento de DNA que transporta. El vector también debe contener di-

Seminario Web 19.1
Tecnología del DNA recombinante: enzimas de restricción

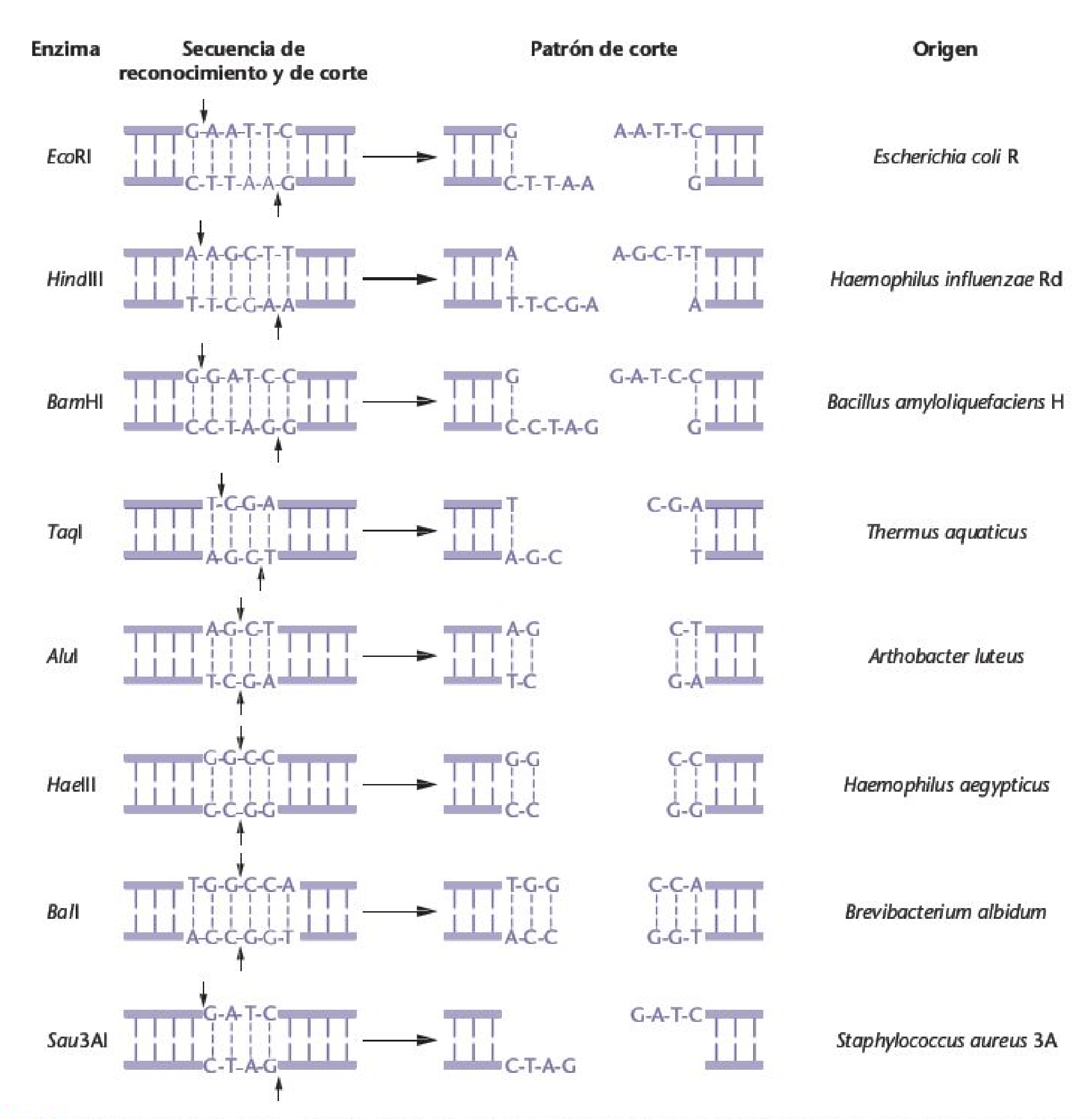


FIGURA 19.2 Algunas enzimas de restricción comunes, con sus secuencias de reconocimiento, los patrones de corte y su origen.

versas secuencias de reconocimiento que permitan la inserción del fragmento de DNA a clonar. Para insertar un fragmento de DNA, se corta el vector con una enzima de restricción y se mezcla con una colección de fragmentos de DNA producidos con la misma enzima. Los vectores que transportan un fragmento insertado se denominan **vectores recombinantes**, siendo todos ellos un ejemplo de molécula de DNA recombinante producida por la unión de DNA de dos fuentes diferentes.

Para distinguir las células huésped que han incorporado vectores de las que no los contienen, el vector debe llevar un gen marcador de selección (generalmente genes de resistencia a antibióticos o genes que codifican enzimas ausentes en la célula huésped). Finalmente, debería ser fácil recuperar el vector y el DNA insertado de la célula huésped.

Los vectores plasmídicos

Los primeros vectores que se desarrollaron, y que todavía se usan ampliamente, fueron plásmidos modificados genéticamente. Estos vectores plasmídicos proceden de moléculas de DNA de doble cadena extracromosómicas que se encuentran de manera natural, que se replican autónomamente dentro de las células bacterianas (Figura 19.5). La genética de los plásmidos y de las células bacterianas se discutió en los Capítulos 6 y 16. En esta sección se enfatizará la utilización de los plásmidos como vectores para clonar DNA. Los plásmidos se han modificado enormemente mediante ingeniería genética para servir de vectores de clonación. Actualmente se dispone de muchos vectores plasmídicos genéticamente modificados con una gama

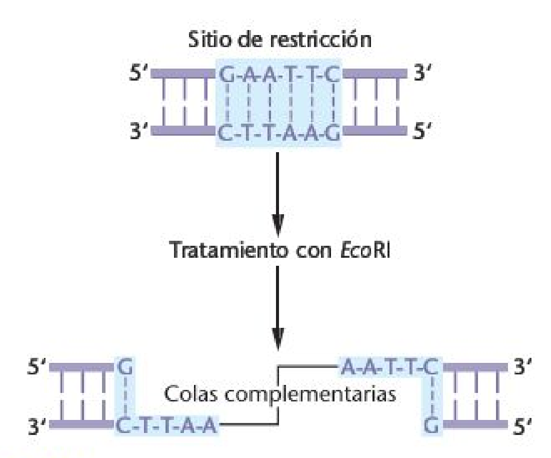


FIGURA 19.3 La enzima de restricción EcoRI reconoce y se une a la secuencia palindrómica GAATTC. El corte del DNA en esta secuencia produce colas de cadena sencilla complementarias. Estas colas de cadena sencilla pueden hibridar con colas complementarias de otros fragmentos de DNA para formar moléculas de DNA recombinante.

de características útiles. Por ejemplo, aunque generalmente en la célula bacteriana huésped solo entra un plásmido, una vez dentro algunos plásmidos pueden incrementar el número de copias de manera que haya diversos centenares de ellos presentes en la célula. Como vectores, estos plásmidos permiten la producción de muchas copias del DNA clonado. Por conveniencia, estos vectores también se han modificado genéticamente para que contengan un número adecuado de secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción y con genes marcadores que revelen su presencia en las células huésped.

Uno de estos plásmidos es **pUC18** (Figura 19.6), que tiene diversas características útiles como vector.

1. Es pequeño (2686 pb), por lo que puede transportar insertos de DNA relativamente grandes.
2. Tiene un origen de replicación y puede producir hasta 500 copias de los fragmentos de DNA insertado por célula.
3. Se ha modificado para que contenga muchas secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, que se han agrupado convenientemente en una región denominada **sitio de clonación múltiple** (*polylinker*).
4. Permite la identificación sencilla de los plásmidos recombinantes. Por ejemplo, pUC18 contiene un fragmento del gen bacteriano *lacZ*, y el sitio de clonación múltiple está insertado dentro de este fragmento. La expresión de *lacZ* hace que las células huésped bacterianas que contienen pUC18 produzcan colonias azules cuando se las hace crecer en un medio que contiene un compuesto químico denominado Xgal. Si se inserta un fragmento de DNA en el sitio de clonación múltiple se inactiva el gen lacZ, y la célula bacteriana que contiene pUC18 con un fragmento de DNA insertado forma colonias blancas, lo que hace que se fácil identificarlas (Figura 19.7).

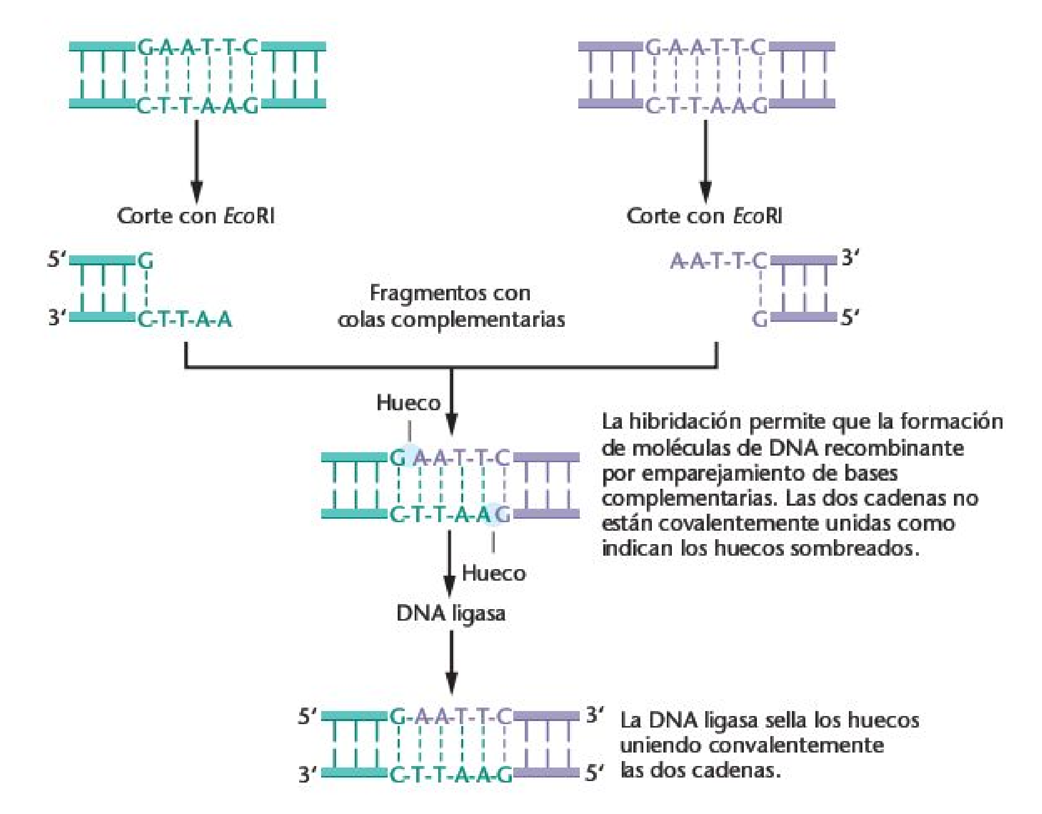


FIGURA 19.4 Se corta DNA de distintas fuentes con EcoRI y se mezcla para que hibriden formando moléculas recombinantes. Después se utiliza la enzima DNA ligasa para unir químicamente estos fragmentos hibridados en moléculas de DNA recombinante intactas.

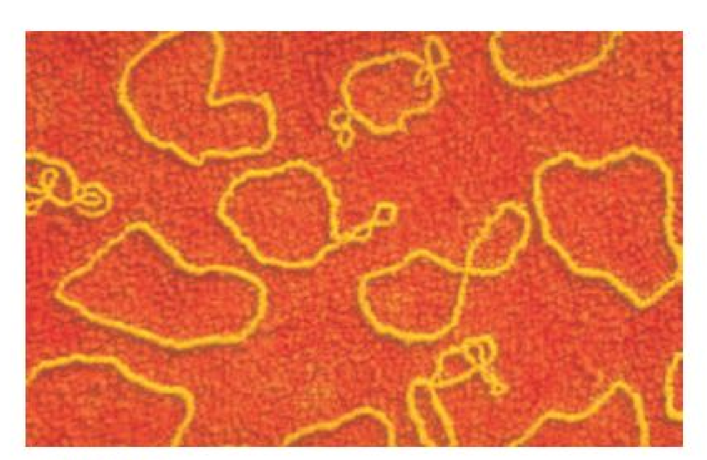


FIGURA 19.5 Micrografía electrónica con intensificación de color de moléculas de plásmido circulares aisladas de *E. coli*. Plásmidos genéticamente modificados se utilizan como vectores para la clonación de DNA.



FIGURA 19.7 Placa de Petri que muestra el crecimiento de las células bacterianas después de incorporar plásmidos recombinantes. El medio de la placa contiene un compuesto denominado Xgal. Los insertos de DNA en el vector pUC18 interrumpen el gen responsable de la formación de colonias azules. Las células de las colonias azules no contienen ningún inserto de DNA clonado, mientras que las colonias blancas contienen vectores que transportan insertos de DNA.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que los fragmentos de DNA se han incorporado en un vector plasmídico?

El bacteriófago lambda (λ)

Generalmente, los vectores plasmídicos transportan hasta 10 kb de DNA insertado, pero para muchos experimentos se necesitan trozos más largos. En estos casos se utilizan como vectores cepas modificadas del **fago λ** (Figura 19.8). El genoma del fago λ se ha cartografiado y secuenciado completamente. Para ser utilizado de vector, el tercio central de su cromosoma puede ser reemplazado por el DNA foráneo, sin que ello afecte la capacidad del fago de infectar células y formar calvas (Figura 19.9).

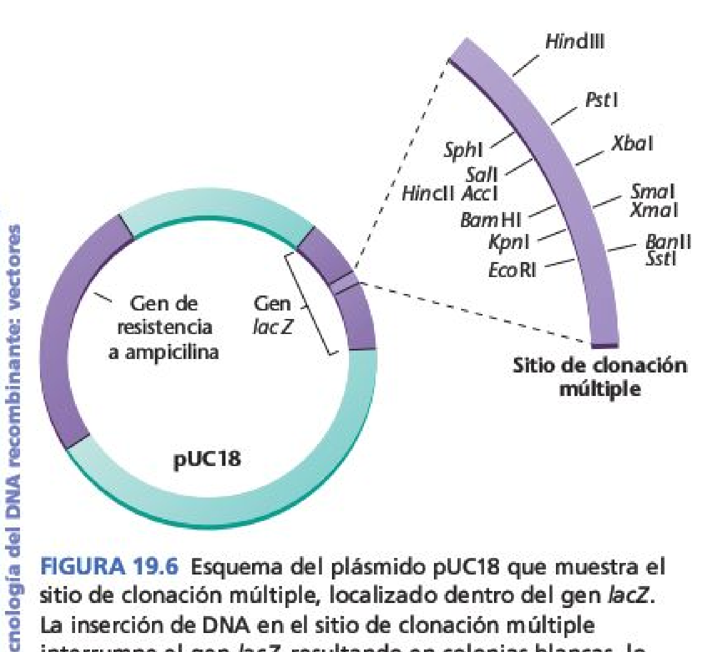


FIGURA 19.6 Esquema del plásmido pUC18 que muestra el sitio de clonación múltiple, localizado dentro del gen *lacZ*. La inserción de DNA en el sitio de clonación múltiple interrumpe el gen *lacZ*, resultando en colonias blancas, lo que permite la identificación directa de las colonias bacterianas que transportan insertos de DNA clonados.

Para clonar DNA utilizando este vector, se purifica el DNA del fago y se corta con una enzima de restricción como *Eco*RI, lo que produce tres fragmentos cromosómicos: el brazo izquierdo, el brazo derecho y la región central prescindible. Se aíslan los brazos y se mezclan con el DNA de otra fuente, que también se ha cortado con *Eco*RI. La ligación con la DNA ligasa produce vectores recombinantes. Los vectores λ recombinantes se empaquetan *in vitro* en las cápsides proteicas del fago, y se introducen en células huésped bacterianas. Dentro de las bacterias, los vectores se replican y forman muchas copias de fago infectivo, llevando todas ellas el inserto de DNA. Al reproducirse, lisan las células huésped bacterianas formando manchas claras en las placas de Petri conocidas como calvas, de las que se puede recuperar el DNA clonado.

Los vectores fágicos pueden transportar insertos de hasta 20 kb, más del doble que los vectores plasmídicos. Esto representa una ventaja importante cuando se clonan genes grandes o genomas pequeños. Además, algunos vectores fágicos sólo aceptan insertos cuyo tamaño supere un cierto mínimo; no transportan insertos pequeños relativamente inútiles que tengan una longitud de solo unas pocas docenas o unos pocos centenares de nucleótidos.

Seminario Web 19.2
Tecnología del DNA recombinante: vectores



FIGURA 19.8 Micrografía electrónica coloreada del fago λ, ampliamente utilizados como vector para trabajar con DNA recombinante.

Los vectores cósmidos

Los **cósmidos** son vectores híbridos construidos utilizando partes del cromosoma de lambda y de plásmidos. Los cósmidos contienen la secuencia *cos* del fago lambda, necesaria para el empaquetamiento del DNA del fago dentro de su cubierta proteica, y secuencias plasmídicas necesarias para la replicación. También tienen genes de resistencia a antibióticos de origen plasmídico (Figura 19.10), que ayudan a identificar las células huésped que contienen los cósmidos recombinantes. Después de insertar fragmentos de DNA, los cósmidos recombinantes se empaquetan en la cápside proteica de lambda para formar partículas fágicas infectivas. Una vez entra en la célula huésped bacteriana, el cósmido se replica como un plásmido. Puesto que sólo se conserva una pequeña parte del genoma de lambda se ha delecionado, los cósmidos pueden transportar insertos de DNA mucho más grandes que los que puede llevar el vector lambda. Los cósmidos pueden transportar casi 50 kb de DNA insertado, mientras que los vectores fágicos pueden acomodar insertos de DNA de 10-15 kb de longitud.

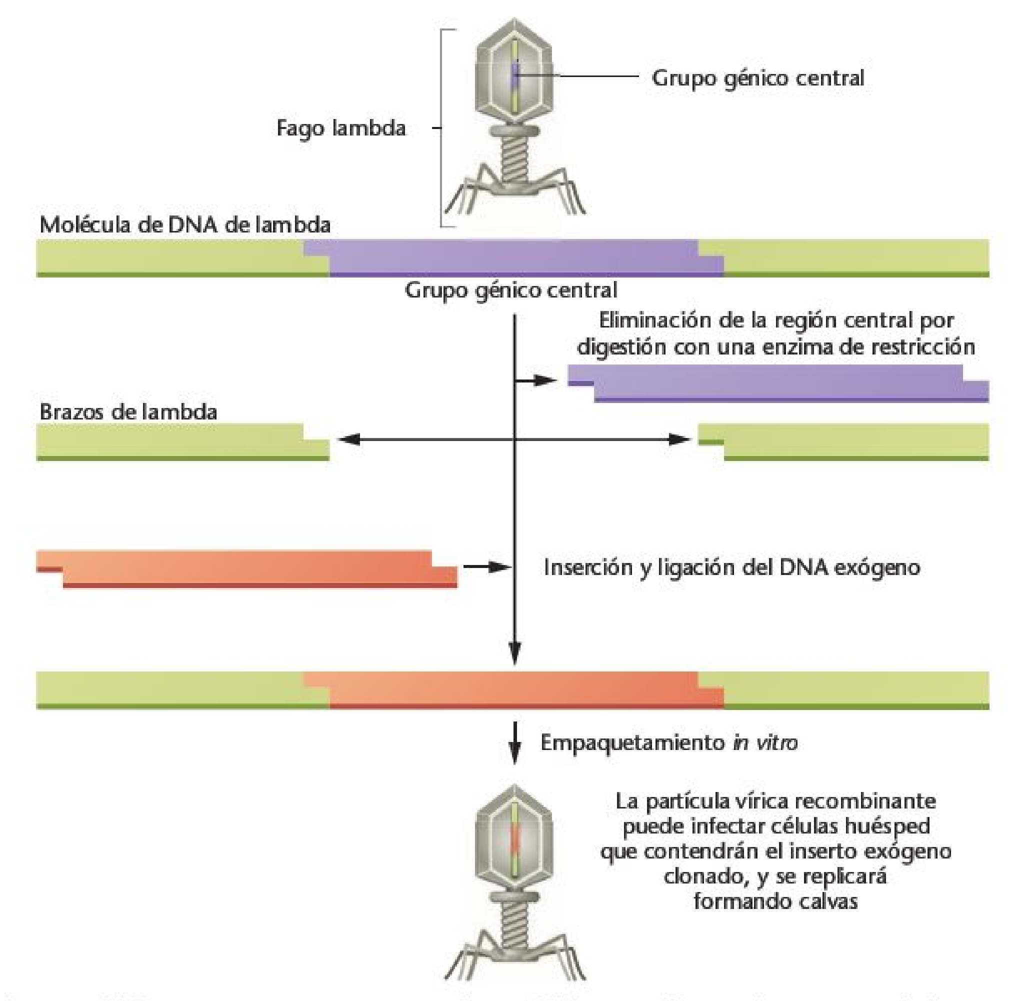


FIGURA 19.9 Utilización del fago λ como vector. Se extrae el DNA del fago, se elimina el grupo central de genes y el DNA a clonar se liga entre los brazos del cromosoma del fago λ. Luego se empaqueta el cromosoma recombinante dentro de las proteínas del fago para formar un virus recombinante.

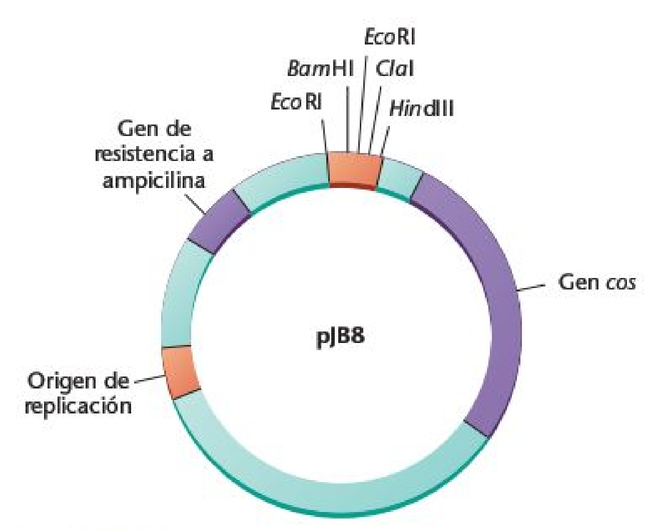


FIGURA 19.10 El cósmido pJB8 contiene un origen de replicación bacteriano (*ori*), una sola secuencia cos (*cos*), un gen de resistencia a ampicilina (*amp*, para seleccionar las colonias que han incorporado el cósmido), y una región que contiene cuatro sitios para la clonación (*BamHI*, *EcoRI*, *ClaI* y *HindIII*). Puesto que el vector es pequeño (5,4 kb de longitud), puede aceptar segmentos de DNA exógeno de 33 a 46 kb de longitud. El sitio cos permite que el cósmido que contenga un inserto grande se empaquete con proteínas de cubierta vírica de lambda como si fuesen cromosomas víricos. Las cubiertas víricas que contienen un cósmido pueden utilizarse para infectar células huésped adecuadas, y el vector, que transporta el inserto de DNA, se transferirá a la célula huésped. Una vez dentro, la secuencia *ori* permite que el cósmido se replique como un plásmido bacteriano.

Existen otros vectores híbridos construidos con orígenes de replicación provenientes de distintas fuentes (p.e., virus animales como SV40), que pueden replicarse en más de un tipo de célula huésped y que se denominan vectores transbordadores. Generalmente, estos vectores contienen marcadores genéticos que permiten su selección en los dos tipos de células huésped, y se utilizan para transportar insertos de DNA entre *E. coli* y otras células huésped, como levadura. A menudo, estos vectores se emplean para investigar la expresión génica.

Cromosomas artificiales bacterianos

La cartografía y el análisis de genomas eucarióticos largos y complejos requiere vectores de clonación que puedan transportar fragmentos de DNA muy largos. Además, puesto que algunos genes humanos tienen de 1000 a más de 2000 kb de longitud, para transportar estos genes se necesitan vectores con una gran capacidad de clonación.

Para ello se ha desarrollado un vector con una gran capacidad de clonación, denominado **cromosoma artificial bacteriano (BAC),** basado en el plásmido de fertilidad (factor F) de bacterias. Recuerde que en el Capítulo 6 se expuso que el factor F es un plásmido que se replica independientemente y que transfiere información genética durante la conjugación bacteriana. Puesto que los factores F pueden transportar fragmentos del cromosoma bacteriano de hasta 1 Mb de longitud, han sido diseñados para que funcionen como vectores de DNA eucariótico y puedan transportar insertos de unas 300 kb (Figura 19.11). Los vectores BAC tienen los genes de replicación y de número de copias del factor F, e incorporan al menos un marcador de resistencia a antibióticos y un sitio de clonación múltiple con diversas secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción para insertar el DNA exógeno. Además, el sitio de clonación múltiple está flanqueado por regiones promotoras que pueden utilizarse para generar moléculas de RNA y expresar así el gen clonado, para utilizarlas como sonda para paseo cromosómico, y para secuenciar el DNA del inserto clonado.

Vectores de expresión

Los vectores de expresión estás diseñados para producir muchas copias de una proteína seleccionada en una célula huésped. Se dispone de vectores de expresión tanto para células huésped procarióticas como eucarióticas. pET es uno de los vectores de expresión que se usan en células huésped de *E. coli* (Figura 19.12). Para usar este vector, el gen a expresar se clona en una de las secuencias de reconocimiento del sitio de clonación múltiple, lo que sitúa el gen adyacente al promotor vírico T7 y al operador bacteriano *lac*. El genoma de la célula huésped se ha modificado para que contenga el gen de la polimerasa T7 vírica, el promotor *lac* y el operador *lac*. Después de introducir los plásmidos recombinantes en la célula huésped, se induce la expresión añadiendo IPTG al medio, un análogo de la lactosa. IPTG desplaza el represor del operador *lac*, lo que activa el gen

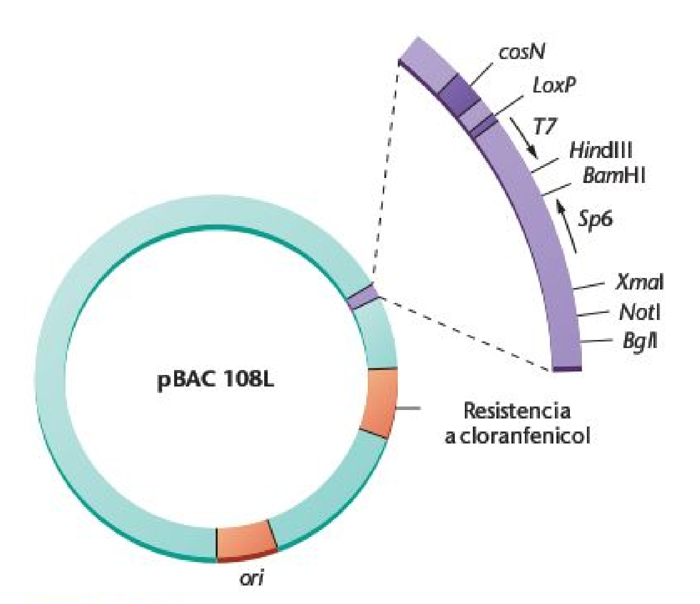


FIGURA 19.11 Cromosoma artificial bacteriano (BAC). El sitio de clonación múltiple tiene diversos sitios de restricción únicos para la inserción de DNA exógeno. Las flechas marcadas como T7 y Sp6 son regiones promotoras que permiten la expresión de los genes clonados entre estas regiones.

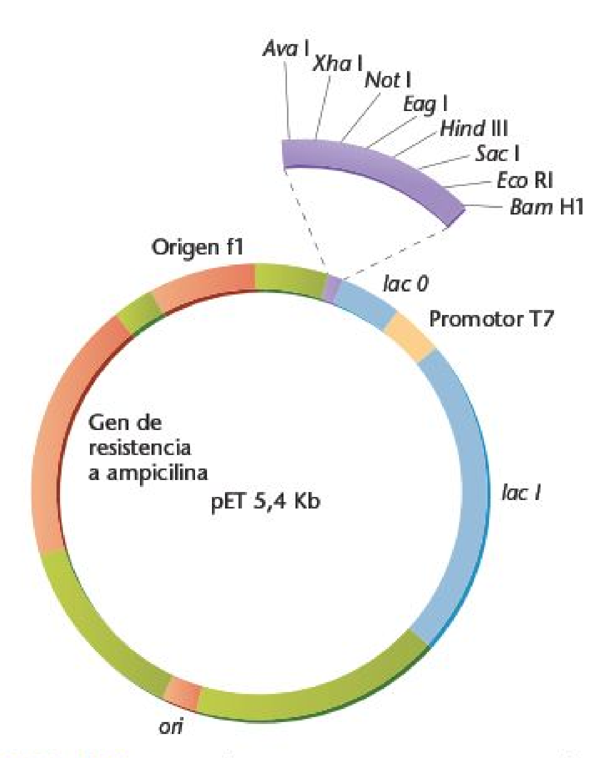


FIGURA 19.12 Vector de expresión pET. Este sistema utiliza una célula huésped modificada genéticamente. La célula huésped contiene el gen vírico de la RNA polimerasa T7 bajo control del promotor y del operador de *lac*, lo que hace que sea inducible por el análogo de la lactosa IPTG. Para que se exprese el gen diana, la célula huésped debe incorporar vectores pET que lo transporten. Si el huésped crece en presencia de IPTG, se desrreprime el gen de la RNA polimerasa T7 y el gen diana del vector pET (que también está bajo control de *lac O*), lo que conduce a la expresión del gen diana. Este sistema combina un promotor fuerte con una regulación muy estricta, y la expresión sólo ocurre es presencia de IPTG.

de la polimerasa T7 del cromosoma bacteriano *y* el gen en el sitio de clonación múltiple. La polimerasa T7 se une al promotor de T7 y transcribe el gen del sitio de clonación múltiple, produciéndose grandes cantidades de la proteína codificada.

19.5 El DNA se clonó primero en células huésped procarióticas

Como se ha discutido con anterioridad, los científicos usan la tecnología del DNA recombinante para construir y replicar moléculas de DNA recombinante para hacer copias clonadas de secuencias específicas. La replicación se produce tras la transferencia de las moléculas recombinantes en las células huésped. Este método de clonación, conocido como clonación basada en células, fue el primero que se desarrolló, y se utiliza de manera amplia para hacer DNA clonado.

Uno de los huéspedes procarióticos más utilizados es la cepa de laboratorio K12 de *E. coli*. Ésta y otras cepas de *E. coli* están bien caracterizadas genéticamente, y pueden aceptar un amplio espectro de vectores. Para generar moléculas de DNA recombinante y transferirlas a la célula huésped de *E. coli* donde se clonan se precisan varios pasos (Figura 15.13):

1. El DNA que se va a clonar se aísla y se trata con una enzima de restricción para generar fragmentos que terminen en secuencias específicas.
2. Estos fragmentos se ligan a moléculas de plásmido que han sido cortadas con la misma enzima de restricción, obteniéndose un vector recombinante.
3. El vector recombinante se transfiere a la célula huésped de *E. coli*, donde el plásmido recombinante se replica para formar docenas de copias.
4. Se hace crecer la bacteria en una placa de cultivo con un medio nutritivo, donde formará colonias, y éstas se rastrean para identificar las que han incorporado el plásmido recombinante.

Puesto que las células de cada colonia proceden de una sola célula progenitora ancestral, todas las células de la colonia así como los plásmidos que contienen son clones genéticamente idénticos. De manera parecida, los fagos que contienen DNA exógeno se utilizan para infectar células huésped de *E. coli*, y cuando se siembran en un medio sólido, cada calva resultante representa los descendientes clónicos de un único bacteriófago ancestral.

Ahora resuelva esto

La pregunta 19 de la página 558 describe la preparación de una genoteca en un vector que contiene dos genes de resistencia a antibióticos.

Sugerencia: La inserción del DNA exógeno en el vector interrumpe uno de los genes de resistencia del plásmido. Las bacterias que incorporen los plásmidos podrán crecer en un medio que contenga sólo uno de los antibióticos.

19.6 Las células de levadura se usan como huéspedes eucarióticos para la clonación

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza ampliamente como célula huésped para la clonación y la expresión de genes eucarióticos por cinco razones. (1) Aunque la levadura es un organismo eucariótico, se puede cultivar y manipular de manera muy parecida a las células bacterianas. (2) Se ha estudiado mucho la genética de levadura, lo que ha proporcionado un gran catálogo de mutaciones y un mapa genético muy desarrollado. (3) Se ha secuenciado todo el genoma de la levadura, y se han identificado la mayor parte de sus genes.

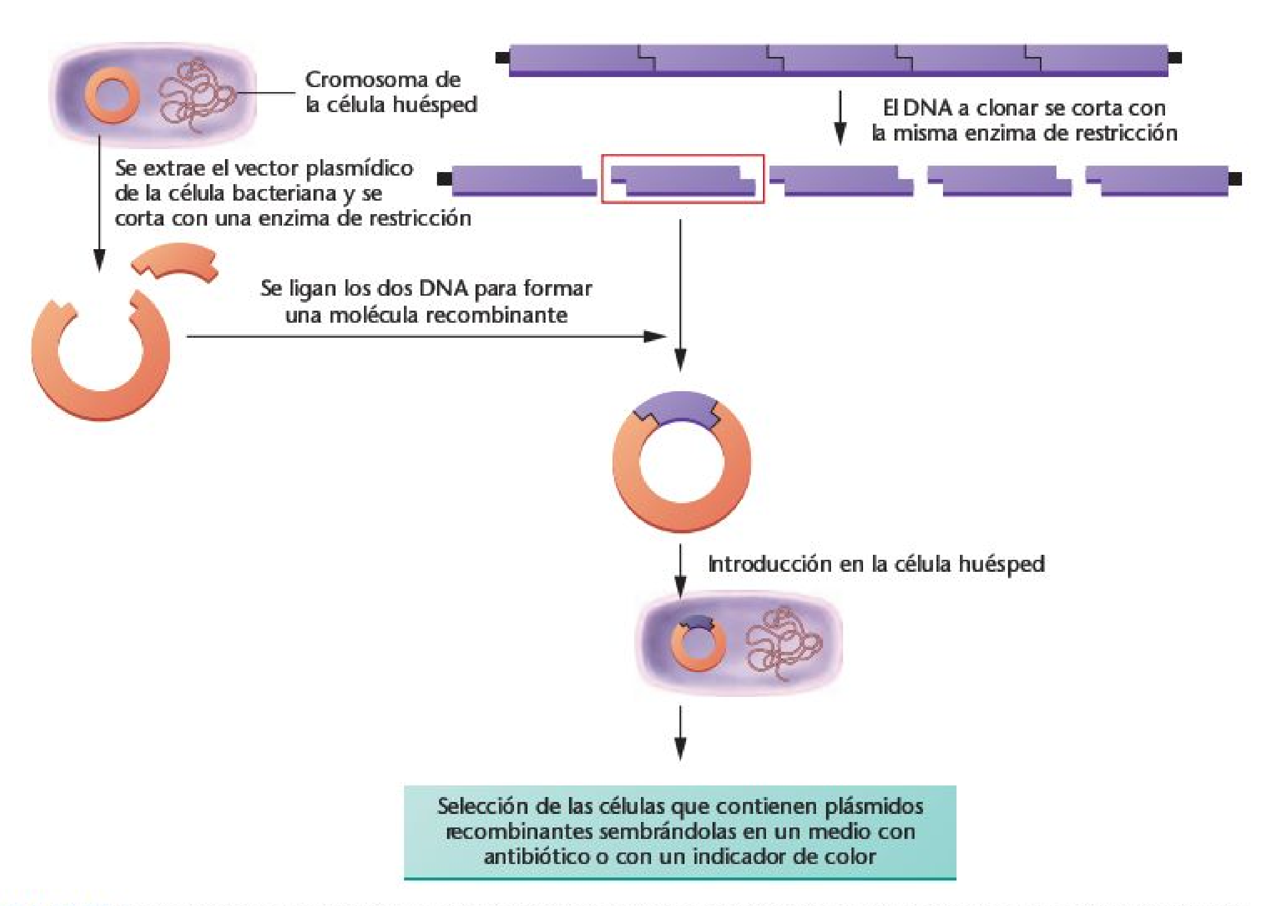


FIGURA 19.13 La clonación con un vector plasmídico implica cortar el plásmido y el DNA a clonar con la misma enzima de restricción. El DNA a clonar se inserta en el vector, que se transfiere a la célula huésped para que se replique. Las células bacterianas que contienen plásmidos con insertos de DNA pueden identificarse por crecimiento en un medio selectivo, y pueden aislarse. Entonces el DNA clonado puede recuperarse del huésped bacteriano para nuevos análisis.

(4) Para estudiar la función de algunas proteínas eucarióticas, es necesario usar una célula huésped eucariótica puede modificar la proteína postrancripcionalmente, de manera que se pliegue en su forma funcional. Las células huésped bacterianas no pueden realizar estas modificaciones, y degradan las proteínas mal plegadas con gran rapidez. (5) Durante siglos se han utilizado levaduras para la panificación y la elaboración de cervezas, y se considera que es un organismo seguro para producir proteínas para vacunas y como agentes terapéuticos. La Tabla 19.1 enumera algunos de los productos clonados en levadura.

Se han desarrollado diversos tipos de vectores de clonación para levaduras, entre los que cabe destacar los **cromosomas artificiales de levadura** (**YAC**, del inglés *yeast artificial chromosome*) (Figura 19.14). Como los cromosomas naturales, un YAC tiene telómeros en sus extremos, un origen de replicación (que inicia la síntesis de DNA) y un centrómero. Estos componentes están unidos a genes marcadores de selección (*TRP1* y *URA3*), y a un grupo de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción para insertar DNA exógeno. El tamaño de los cromosomas de levadura va de 230 kb a más de 1900 kb, lo que permite clonar insertos de DNA de 100 a 1000 kb en los YAC. La posibilidad de clonar grandes trozos de DNA en estos vectores los convierte en unas herramientas importantes de los proyectos genoma, incluido el Proyecto Genoma Humano. (Véase el Capítulo 20).

Aunque la clonación en vectores de levadura y en las células huésped correspondientes es el sistema eucariótico actual más avanzado, se están desarrollando otros sistemas, entre los que cabe incluir vectores cromosómicos artificiales humanos utilizando células de mamífero como huéspedes.

19.7 Se pueden transferir genes a células eucarióticas

Aparte de levadura, tanto las células vegetales como las animales pueden incorporar DNA del medio ambiente. Además, se pueden utilizar distintos tipos de vectores para transferir DNA a células eucarióticas, incluidos los YAC. Cuando el vector es un plásmido, la transferencia de DNA se denomina **transformación**. Cuando el vector es un virus, la incorporación se denomina **transfección**.

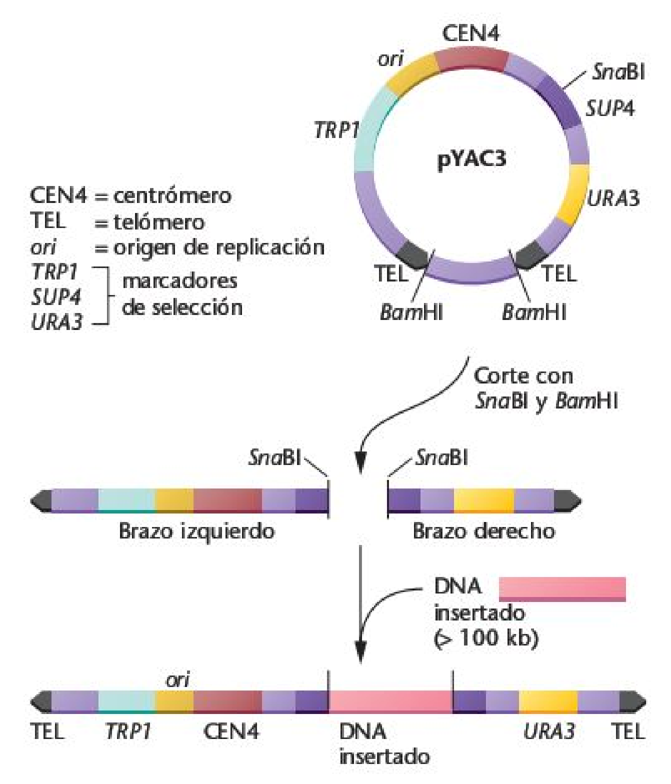


FIGURA 19.14 El cromosoma artificial de levadura pYAC3 contiene secuencias teloméricas (TEL), un centrómero (CEN) procedente del cromosoma 4 de levadura y un origen de replicación (*ori*). Estos elementos dan al vector de clonación las propiedades de un cromosoma. *TRP1* y *URA3* son genes de levadura que sirven de marcadores de selección para los brazos izquierdo y derecho del cromosoma. Dentro del gen *SUP4* hay una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *SnaB1*. Hay dos secuencias de reconocimiento para *BamH1* que flanquean un segmento espaciador. El corte con *SnaB1* y *BamH1* rompe el cromosoma artificial en dos brazos. Se trata el DNA a clonar con *SnaB1*, lo que produce una colección de fragmentos. Los brazos y los fragmentos se ligan juntos, y el cromosoma artificial se inserta en células huésped de levadura. Puesto que los cromosomas de levadura son grandes, el cromosoma artificial puede aceptar insertos del orden del millón de pares de bases.

TABLA 19.1 PROTEÍNAS RECOMBINANTES SINTETIZADAS EN CÉLULAS DE LEVADURA

Proteína de superficie del virus de la hepatitis B
Proteína del parásito de la Malaria
Factor de crecimieno epidérmico *(epidermal growth factor)*
Factor de crecimiento procedente de plaquetas *(platelet-derived growth factor)*
α_1-antitripsina
Factor de coagulación XIIIA

Células huésped vegetales

La transferencia de genes a plantas superiores utiliza vectores plasmídicos bacterianos. La bacteria del suelo *Agrobacterium tumifaciens* infecta células vegetales y produce tumores (denominados *agalla de la corona*) en muchas especies de plantas. La formación de los tumores se asocia a la presencia de un plásmido inductor de tumores (Ti) en las bacterias (Figura 19.15). Cuando las bacterias que contiene un plásmido Ti infectan células vegetales, un segmento del plásmido Ti, conocido como *T-DNA*, se transfiere genoma de la célula vegetal huésped. Este T-DNA contiene genes que controlan la formación del tumor y la síntesis de moléculas necesarias para el crecimiento de la bacteria infecciosa. Se pueden insertar genes exógenos en el T-DNA, y una infección con *A. tumefaciens* puede transferir el plásmido recombinante a la célula vegetal. Una vez dentro de la célula, el DNA exógeno se inserta en el genoma de la planta cuando el T-DNA se integra en el cromosoma de la célula huésped. Las células vegetales que llevan un plásmido Ti recombinante pueden crecer en un medio de cultivo y formar una masa celular denominada *callo*. Si se cambia el medio de cultivo, es posible inducir la formación de raíces y de brotes a partir del callo, y con el tiempo una planta adulta que contenga el gen exógeno.

Las plantas (o los animales) que contienen un gen exógeno se denominan **transgénicas**. En el Capítulo 22 veremos como se ha utilizado la transferencia de genes para alterar gramíneas.

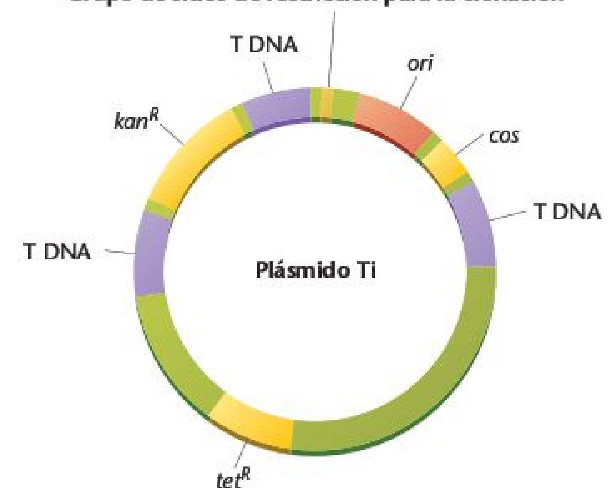


FIGURA 19.15 Plásmido Ti diseñado para la clonación en plantas. Segmentos del T-DNA, incluyendo los necesarios para la integración, se combinan con segmentos bacterianos que incorporan sitios de clonación y genes de resistencia a antibióticos (kan^R y tet^R). El vector también contiene un origen de replicación (*ori*) y una secuencia cos de lambda, que permite recuperar el inserto clonado de la célula vegetal huésped.

Células huésped de mamífero

Se puede transferir DNA a células de mamífero mediante diversos métodos, incluyendo la endocitosis o la encapsulación del DNA en membranas artificiales (liposomas) seguido por la fusión con las membranas celulares. El DNA también puede transferirse utilizando YAC y vectores basados en retrovirus. Generalmente, el DNA introducido en una célula de mamífero por cualquiera de estos métodos se integra en el genoma del huésped. Para producir animales transgénicos se utiliza la transferencia de genes en ovocitos fecundados. Los mismos métodos se utilizan para replicar genes clonados utilizando células de mamífero como huésped.

Los YAC se utilizan como vectores por diversos motivos, siendo uno de ellos el incremento de la eficiencia de la transferencia de genes a la línea germinal de ratón. El primer paso para producir ratones transgénicos implica la transferencia de un YAC recombinante al núcleo de una célula de ratón adecuada, a lo que sigue la integración del DNA en un cromosoma.

Los YAC pueden transferirse a ratones de diversas maneras. La primera implica la microinyección de DNA purificado de YAC en el núcleo de un ovocito de ratón (Figura 19.16). Entonces los zigotos transgénicos se transfieren al útero de madres adoptivas para que se desarrollen. Los YAC también se pueden transferir a células madre embrionarias de ratón (células ES, del inglés *embryonic stem cell*). Esto puede hacerse fusionando una célula de levadura que contiene un YAC con una célula madre de ratón, transfiriéndose el YAC y todo o la mayor parte del genoma de levadura a la célula ES. Estas células ES trangénicas se inyectan a embriones de ratón iniciales, donde participaran en la formación de los tejidos de adultos, incluyendo los que formarán la línea germinal.

La capacidad de transferir segmentos largos de DNA a ratones tiene aplicaciones en muchas áreas de investigación. Algunas de ellas se describirán en el Capítulo 22.

Otros vectores para células de mamífero se basan en retrovirus modificados de ave y de ratón. El genoma de estos retrovirus es un RNA de cadena sencilla que, mediante la retrotranscriptasa, se transcribe en un DNA de doble cadena. Este DNA se integra en el genoma del huésped y pasa a las células hija como parte de su propio cromosoma. Tras infectar la célula huésped, la transcriptasa reversa transcribe el RNA a una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA, del inglés *double-stranded DNA*). Este dsDNA se integra en el genoma del huésped y se transmite a las células hijas durante la división celular. Se puede modificar el genoma del retrovirus para eliminar algunos genes víricos, generando vectores que acepten DNA exógeno, incluyendo genes humanos. Estos vectores se usan para tratar de enfermedades genéticas mediante terapia génica, un tema que también se discute en el Capítulo 22.

19.8 La reacción en cadena de la polimerasa hace copias de DNA sin células huésped

Las técnicas de DNA recombinante se desarrollaron a principios de la década de 1970, y revolucionaron la investigación en genética y en biología molecular. Estos métodos también permitieron el nacimiento de la expansiva industria biotecnológica. Sin embargo, a menudo la clonación de DNA utilizando vectores y células huésped requiere mucho trabajo y tiempo. En 1986 se desarrolló otra técnica, la denominada **reacción en cadena de**

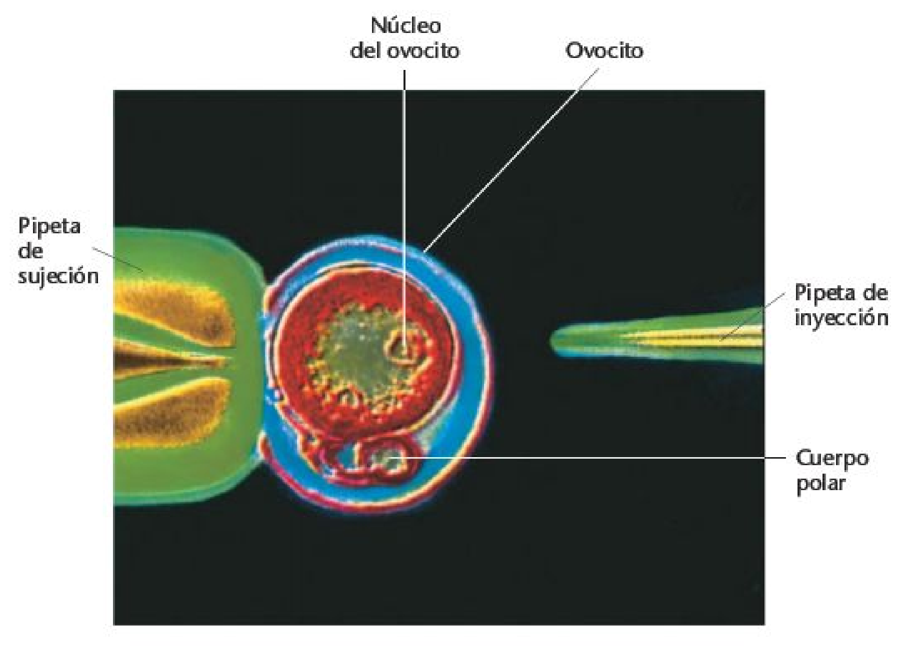


FIGURA 19.16 El DNA clonado puede transferirse a embriones de mamífero por inyección directa en el ovocito..

la polimerasa (PCR). Este avance volvió a revolucionar la metodología del DNA recombinante, y aceleró todavía más el ritmo de la investigación en biología. La importancia de este método fue infravalorada al conceder el premio Nobel de Química de 1993 a Kary Mullis por el desarrollo de la técnica de PCR.

La PCR es un método rápido de clonar DNA que incrementa el potencial de la investigación de DNA recombinante y elimina la necesidad de células huésped para clonar de DNA. Aunque la clonación basada en células huésped todavía se usa de manera amplia, la PCR es el método de elección en muchas aplicaciones, incluyendo la biología molecular, la genética humana, la evolución, el desarrollo, la conservación y la medicina forense.

La PCR copia secuencias específicas de DNA mediante una serie de reacciones *in vitro*, y puede amplificar secuencias diana de DNA presentes en cantidades infinitesimales entre una población de otras moléculas de DNA. Uno de los prerrequisitos para la PCR es que se precisa de alguna información sobre la secuencia nucleotídica del DNA a clonar. La información de la secuencia se utiliza para sintetizar dos cebadores oligonucleotídicos: uno para el extremo 5′ y otro para el extremo 3′ de la secuencia que se clonará. Se añaden los cebadores a una muestra de DNA cuyas moléculas se han separado en cadenas sencillas. Los cebadores se unen a los nucleótidos complementarios que flanquean la secuencia a clonar. Después de la hibridación se añade una DNA polimerasa que sea resistente al calor, y ésta sintetiza una segunda cadena de DNA (Figura 19.17). La repetición de estos pasos genera más copias del DNA.

En la práctica, la reacción de PCR implica tres pasos. En teoría, la cantidad de DNA amplificado que se produce sólo está limitada por el número de veces que se repiten estos pasos.

1. El DNA a clonar se *desnaturaliza* en cadenas sencillas. Este DNA puede provenir de muchas fuentes diferentes, incluyendo DNA genómico, restos momificados, fósiles y muestras forenses como sangre seca o semen, pelos aislados y muestras almacenadas en registros médicos. El DNA de doble cadena se desnaturaliza calentándolo a unos 90-95°C, lo que lo disocia en sus cadenas sencillas (normalmente en unos 5 minutos).
2. Se disminuye la temperatura de la reacción hasta 50-70ºC, la denominada temperatura de *hibridación*, a la que los cebadores se unen al DNA de cadena sencilla. Como ya se ha dicho, los cebadores son oligonucleótidos sintéticos (de 15 a 30 nucleótidos de longitud) complementarios a las secuencias que flanquean el DNA diana a copiar. Los cebadores sirven de punto de iniciación para la síntesis de nuevas cadenas de DNA complementarias al DNA diana.
3. A la mezcla de reacción se le añade una DNA polimerasa resistente al calor (la polimerasa *Taq*). La síntesis de DNA se realiza a una temperatura de 70 a 75ºC. La polimerasa *Taq extiende* los cebadores añadiendo nucleótidos en dirección 5′-3′, haciendo una copia de doble cadena del DNA diana.

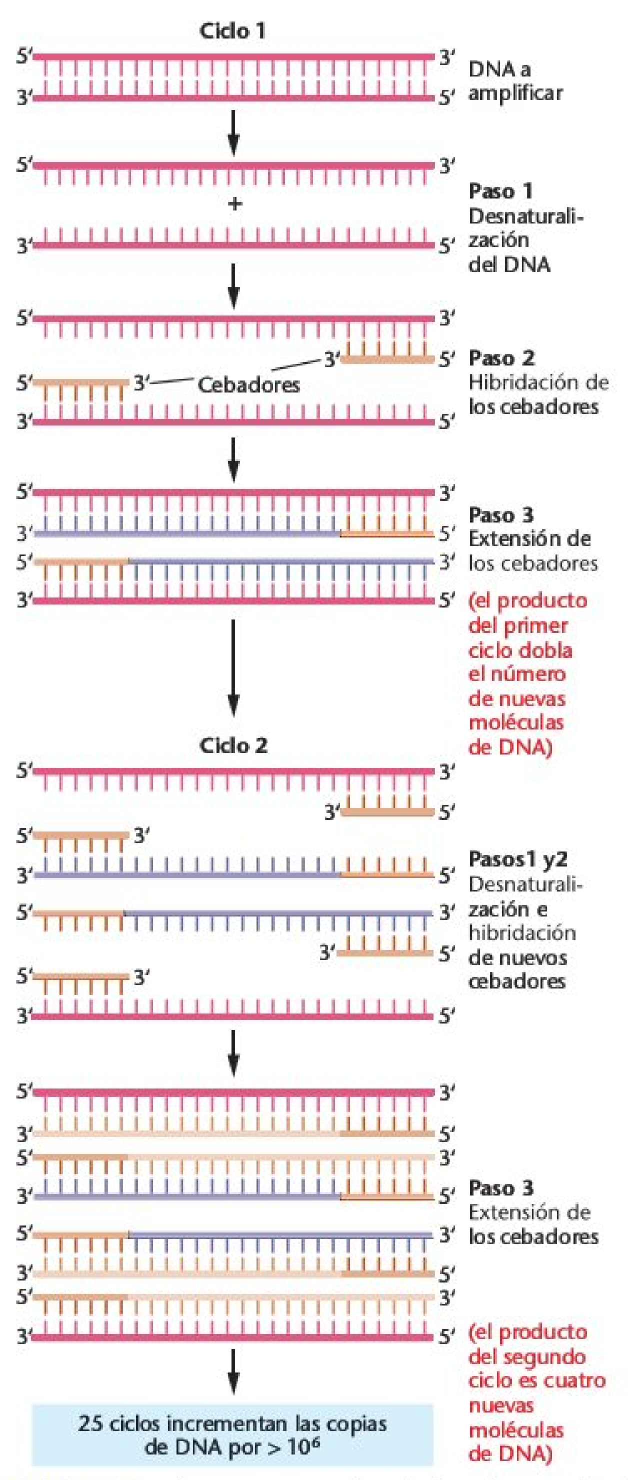


FIGURA 19.17 En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el DNA diana se desnaturaliza en cadenas sencillas; entonces cada cadena se hibrida con un cebador complementario corto. La DNA polimerasa y los nucleótidos extienden el cebador en dirección 3′, utilizando el DNA de cadena sencilla como molde. El resultado es una molécula de DNA de doble cadena recién sintetizada con los cebadores incorporados en ella. La repetición de los ciclos de PCR puede amplificar la secuencia original de DNA más de un millón de veces.

Seminario Web 19.3
Reacción en cadena de la polimerasa

Cada grupo de tres pasos, **desnaturalización** del DNA de doble cadena, **hibridación de los cebadores**, y **extensión** por la polimerasa, es un ciclo. La PCR es una reacción en cadena porque el número de cadenas nuevas de DNA se dobla a cada ciclo, y las nuevas cadenas, junto con las viejas, sirven de molde para el siguiente ciclo. Cada ciclo, que dura unos 5 minutos, puede repetirse, y en menos de 3 horas, en unos 25-30 ciclos, la cantidad de DNA aumenta más de un millón de veces (Figura 19.17). Este proceso está automatizado y lo realiza una máquina denominada *termociclador*, que se puede programar para que realice un número predeterminado de ciclos, produciendo grandes cantidades de segmentos específicos de DNA que se pueden usar para muchos propósitos, incluyendo la clonación en vectores plasmídicos, la secuenciación de DNA, diagnósticos clínicos y rastreos genéticos.

La clonación de DNA basada en la PCR presenta diversas ventajas respecto la clonación basada en células. La PCR es rápida, y puede realizarse en unas pocas horas, en vez de en días, como la clonación basada en células. Además, el diseño de los cebadores para la PCR se hace automáticamente con un programa de ordenador, y la síntesis comercial de oligonucleótidos también es rápida y económica.

La PCR también es muy sensible, y amplifica secuencias específicas de DNA a partir de pequeñas muestras de DNA prácticamente indetectables, incluyendo el DNA de una sola célula. Esta característica de la PCR tiene un valor incalculable en diversas áreas, incluyendo las pruebas genéticas, la medicina forense y la paleontología molecular. También pueden usarse muestras de DNA que están parcialmente degradadas, que se encuentran mezcladas con otros materiales, o que están incluidas en un medio (como el ámbar), lo que sería difícil o imposible con las técnicas de clonación convencionales.

Limitaciones de la PCR

Aunque la PCR es una técnica muy valiosa, también tiene sus limitaciones: se debe disponer de alguna información sobre la secuencia de nucleótidos del DNA diana, y cualquier contaminación de la muestra con DNA de otras fuentes, por pequeña que ésta sea, puede causar problemas. Por ejemplo, células desprendidas de la piel del investigador pueden contaminar las muestras recogidas del escenario de un crimen o tomadas de un fósil, lo que dificulta la obtención de resultados precisos. Las reacciones de PCR siempre deben realizarse en paralelo con controles adecuados cuidadosamente diseñados.

Otras aplicaciones de la PCR

Actualmente, la clonación de DNA por PCR es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en genética y en biología molecular. La PCR y sus variantes tienen muchas otras aplicaciones. Identifica rápidamente variaciones en las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, así como también variaciones en el número de repeticiones de secuencias de DNA repetidas en tándem, que pueden usarse como marcadores genéticos en estudios de cartografía génica. Los cebadores específicos de alelo proporcionan una manera de rastrear mutaciones en el DNA genómico, lo que permite determinar con rapidez la naturaleza de una mutación. Se pueden diseñar cebadores que distingan entre dos secuencias diana que se diferencien en un solo nucleótido. Esto permite sintetizar sondas específicas de alelo para pruebas genéticas. El uso de cebadores aleatorios permite amplificar DNA de manera indiscriminada, lo que es especialmente ventajoso para explorar regiones no caracterizadas adyacentes a regiones conocidas. Se ha utilizado la PCR para reforzar la prohibición mundial de vender determinados productos de las ballenas, y para resolver pleitos sobre el árbol genealógico de perros de pura raza. Resumiendo, la PCR es una de las técnicas más versátiles de la genética moderna.

19.9 Las bibliotecas son colecciones de secuencias clonadas

El resultado de una clonación son segmentos de DNA relativamente pequeños, que pueden representar un único gen o incluso solo una porción de un gen. En consecuencia, para explorar aunque solo sea una pequeña fracción del genoma de un organismo, es necesario disponer de una gran colección de clones. El conjunto de clones de DNA procedentes de un sólo individuo se denomina **biblioteca** de clones. Estas bibliotecas pueden representar el genoma completo de un individuo, un solo cromosoma o el conjunto de genes transcripcionalmente activos en un único tipo celular.

Las bibliotecas genómicas

Idealmente, una **biblioteca genómica** (o **genoteca**) contiene al menos una copia de todas las secuencias del genoma de un organismo. Estas bibliotecas se construyen utilizando métodos de clonación con células huésped, ya que los fragmentos clonados por PCR son relativamente pequeños. Para preparar una biblioteca genómica, se extrae DNA de las células o tejidos, se corta con enzimas de restricción y los fragmentos se ligan a vectores. Puesto que algunos vectores (como los plásmidos) solo transportan unos pocos millares de pares de bases de DNA insertado, una consideración importante es seleccionar el vector de modo que la biblioteca contenga todo el genoma en el menor número de clones posible.

¿Cuán grande tiene que ser una biblioteca genómica para tener entre el 95 y el 99 por ciento de probabilidades de contener todas las secuencias del genoma? El número de clones necesarios para contener todas las secuencias de un genoma depende de diversos factores, que incluyen del tamaño medio de los insertos clonados, el tamaño del genoma a clonar y el nivel de probabilidad deseado. El número de clones de una biblioteca puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

donde N es el número de clones necesarios, *P* es la probabilidad de recuperar una secuencia determinada, y *f* es la fracción del genoma presente en cada clon.

Suponga que deseamos preparar una biblioteca del genoma humano suficientemente grande como para que la probabilidad de que contenga todas las secuencias del genoma sea del 99 por ciento. Puesto que el genoma humano es muy grande, la elección del vector es una consideración primordial. Si construyésemos la biblioteca utilizando un vector plasmídico que transportase insertos de un tamaño medio de 5 kb, se necesitarían más de 2,4 millones de clones para tener el 99 por ciento de probabilidad de recuperar una secuencia concreta del genoma. Dado su tamaño, sería difícil rastrear esta biblioteca de manera eficiente. Si como vector usásemos un fago que pudiese transportar insertos cuyo tamaño medio fuese de 17 kb, entonces se necesitarían 800.000 clones para tener una probabilidad del 99 por ciento de encontrar una secuencia humana determinada. Si bien es mucho más pequeña que una genoteca plasmídica, rastrear una biblioteca fágica de este tamaño continuaría siendo una tarea muy costosa. Sin embargo, si la biblioteca se construyese en un vector YAC con un tamaño promedio de insertos de 1 Mb, la biblioteca sólo contendría unos 14.000 YACs, lo que la haría relativamente fácil de rastrear. Los vectores con una gran capacidad de clonación como los YAC son una parte esencial del Proyecto Genoma Humano.

Las bibliotecas específicas de cromosomas

Una biblioteca construida a partir de una fracción subgenómica, como un cromosoma, puede ser muy valiosa para seleccionar genes específicos y para examinar la organización del cromosoma. Se aisló por microdisección un pequeño segmento del cromosoma X de *Drosophila* correspondiente a una región de unas 50 bandas politénicas. Se extrajo el DNA de este fragmento cromosómico, se cortó con una endonucleasa de restricción, y se clonó en un vector lambda. Esta región del cromosoma contiene los genes *white*, *zeste* y *Notch*, así como el sitio original de un elemento transponible que puede transponer un segmento cromosómico a más de un centenar de otros loci dispersos por el genoma. Aunque es técnicamente difícil, este procedimiento produce una biblioteca que contiene solo los genes de interés y sus secuencias adyacentes, lo que ahorra el tiempo y el esfuerzo que habrían sido necesarios si se hubiese rastreado una biblioteca genómica para recuperar todos estos clones.

Las bibliotecas preparadas de cromosomas individuales humanos se hacen utilizando una técnica conocida como citometría de flujo. Para aislar cromosomas individuales, se recogen células mitóticas, y sus cromosomas se tiñen con dos colorantes fluorescentes, uno que se une a los pares A-T y otro a los pares G-C. Los cromosomas teñidos pasan a través de un rayo láser que estimula la fluorescencia, y un fotómetro clasifica y fracciona los cromosomas según las diferencias de unión de los colorantes y de dispersión de la luz (Figura 19.18). Una vez se han aislado los cromosomas, se extrae el DNA, se corta con una enzima de restricción y los fragmentos de DNA se clonan en un vector. Se dispone de bibliotecas de clones para cada cromosoma humano, las cuales han desempeñado un papel importante en el Proyecto Genoma Humano (que se discutirá en el Capítulo 20).

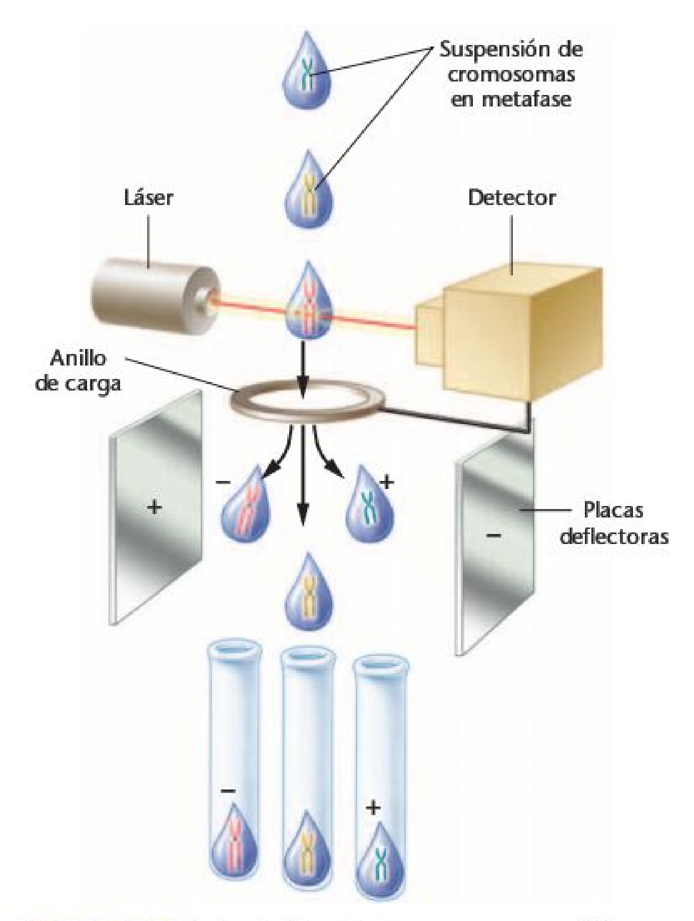


FIGURA 19.18 En la clasificación de cromosomas, se tiñen cromosomas metafásicos con dos colorantes fluorescentes, uno que tiñe los pares de bases AT y otro los pares de bases GC. Microgotas que contienen los cromosomas teñidos fluyen a través de un láser que estimula la fluorescencia de los colorantes. La combinación de la fluorescencia de ambos colorantes produce una señal única para cada cromosoma que es leída por un detector. Al pasar las gotas por un anillo, se puede aplicar una eléctrica a la gota, en función del cromosoma que contiene. Una placa deflectora dirige las gotas a pequeños tubos, produciendo una colección de cromosomas individuales que pueden usarse de fuente de DNA para hacer bibliotecas específicas de cromosoma.

También se han aislado cromosomas individuales para construir bibliotecas de otras maneras. Para aislar los cromosomas de levadura para construir una biblioteca específica de cromosomas, se ha usado una versión de electroforesis en gel conocida como **electroforesis de campo pulsátil** (Figura 19.19). El aislamiento y la construcción de una biblioteca del cromosoma III de levadura (315 kb) fue el punto de partida para el Proyecto Genoma de Levadura, un consorcio de laboratorios que han secuenciado este cromosoma y todo el resto del genoma de levadura.

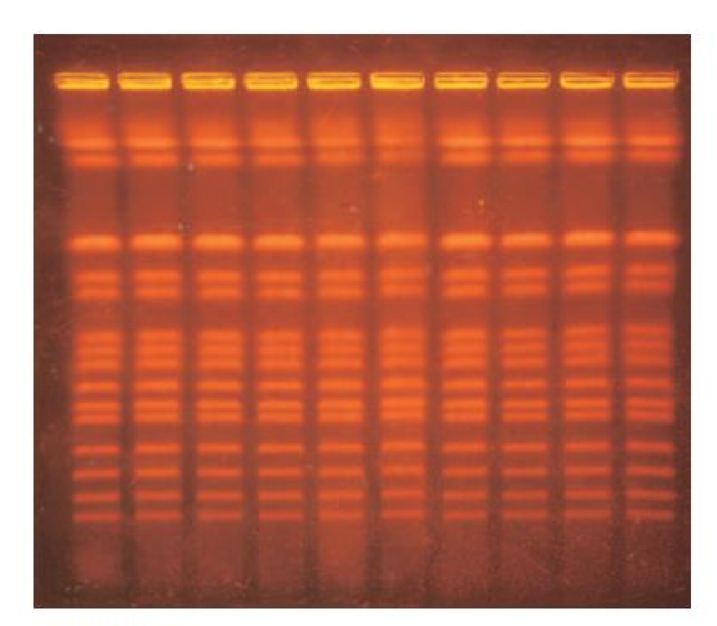


FIGURA 19.19 Cromosomas intactos de levadura separados utilizando un método de electroforesis que emplea una electroforesis en gel de campo pulsante. En cada carril se pueden ver 15 de los 16 cromosomas de levadura separados por tamaño, situándose el más grande en la parte superior.

Uno de los resultados inesperados de la secuenciación de este cromosoma III fue el descubrimiento de que aproximadamente la mitad de los genes de este cromosoma era desconocida. Para muchos genéticos fue difícil aceptar que los métodos convencionales de mutagénesis y cartografiado de genes fuesen tan poco eficientes. Sin embargo, este descubrimiento se confirmó y se amplió cuando se publicó la secuencia del cromosoma XI (664 kb), y cuando en 1996 se terminó la secuenciación de todo genoma de levadura.

Las bibliotecas de cromosomas individuales son valiosas para tener acceso a loci genéticos cuando los métodos convencionales como la mutagénesis y el análisis genético no lo han conseguido y cuando no se dispone de otras sondas, como el mRNA o los productos génicos. Además, las bibliotecas específicas de cromosomas proporcionan un medio para investigar la organización molecular e incluso la secuencia nucleotídica en una región definida del genoma.

Las bibliotecas de cDNA

Disponer de una biblioteca del subconjunto del genoma que se expresa en un tipo celular determinado en un momento dado puede ser una herramienta valiosa para estudiar sucesos específicos del desarrollo, de la muerte celular, del cáncer y de otros procesos biológicos. Las bibliotecas genómicas y cromosómicas contienen todos los genes de un genoma o de un cromosoma, pero estas colecciones no se pueden usar para hallar los genes que son transcripcionalmente activos en una célula.

Una **biblioteca de cDNA** contiene copias de DNA hechas a partir de las moléculas de mRNA presentes en una población celular en un momento dado, y representan los genes transcripcionalmente activos que hay en esa célula en el momento de hacer la biblioteca. Se denomina biblioteca de cDNA porque el DNA es complementario a la secuencia nucleotídica del mRNA.

Los clones de una biblioteca de cDNA son diferentes de los de una biblioteca genómica. El mRNA eucariótico se procesa a partir de los transcritos de pre-mRNA, y durante este procesamiento se eliminan las secuencias intrónicas. Además, una molécula de mRNA no incluye las secuencias adyacentes al gen, que regulan su actividad.

Las bibliotecas de cDNA se preparan aislando el mRNA de una población de células. Esto es posible porque casi todas las moléculas de mRNA eucarióticas contienen una cola de poli-A en su extremo 3′. Se aíslan los mRNA con colas de poli-A, y se usan de molde para sintetizar moléculas de **DNA complementario (cDNA)**. Posteriormente, para producir la biblioteca de cDNA, que es una instantánea de los genes que eran transcripcionalmente activos en un momento dado, se clonan las moléculas de cDNA en vectores.

Para hacer una biblioteca de cDNA, el primer paso es mezclar los mRNA con colas de poli-A con cebadores de oligo-dT, que hibridan con el poli-A formando un producto que contiene una parte de doble cadena (Figura 19.20). La enzima **retrotranscriptasa** extiende el cebador y sintetiza una copia de DNA complementario a la secuencia del mRNA. El producto de esta reacción es una molécula híbrida de doble cadena mRNA-DNA. La acción de la enzima **RNasa H** introduce cortes en la cadena de RNA digiriéndola parcialmente. Los fragmentos de RNA restantes sirven de cebadores para la enzima DNA polimerasa I. (Esta situación es parecida a la síntesis de la cadena retrasada del DNA en procariotas.) La DNA polimerasa I sintetiza una segunda cadena de DNA y elimina los cebadores de RNA, produciendo un cDNA de doble cadena.

Si se añade una secuencia de unión a los extremos del cDNA, éste se puede clonar en un vector plasmídico o fágico. Las secuencias de unión son cortos oligonucleótidos de doble cadena que contienen secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción (p.e. *Eco*RI). Después de unirlas al cDNA, las secuencias de unión se cortan con *Eco*RI y se ligan a vectores tratados con la misma enzima. Se dispone de muchas bibliotecas de cDNA de células y tejidos en estadios específicos de desarrollo, de diferentes órganos como cerebro, músculo, riñón, etc. Estas bibliotecas proporcionan un catálogo de instantáneas de todos los genes activos en una célula en un momento específico.

También se puede preparar una biblioteca de cDNA utilizando una variante de la PCR denominada **PCR con retrotranscriptasa (RT-PCR)**. En este procedimiento, se utiliza retrotranscriptasa para generar copias de cDNA de cadena sencilla de las moléculas de mRNA, como se ha descrito. A esta reacción le sigue una PCR que copia el DNA de cadena sencilla en moléculas de doble cadena, y luego éstas se amplifican y se producen muchas copias. Se añade la polimerasa Taq y

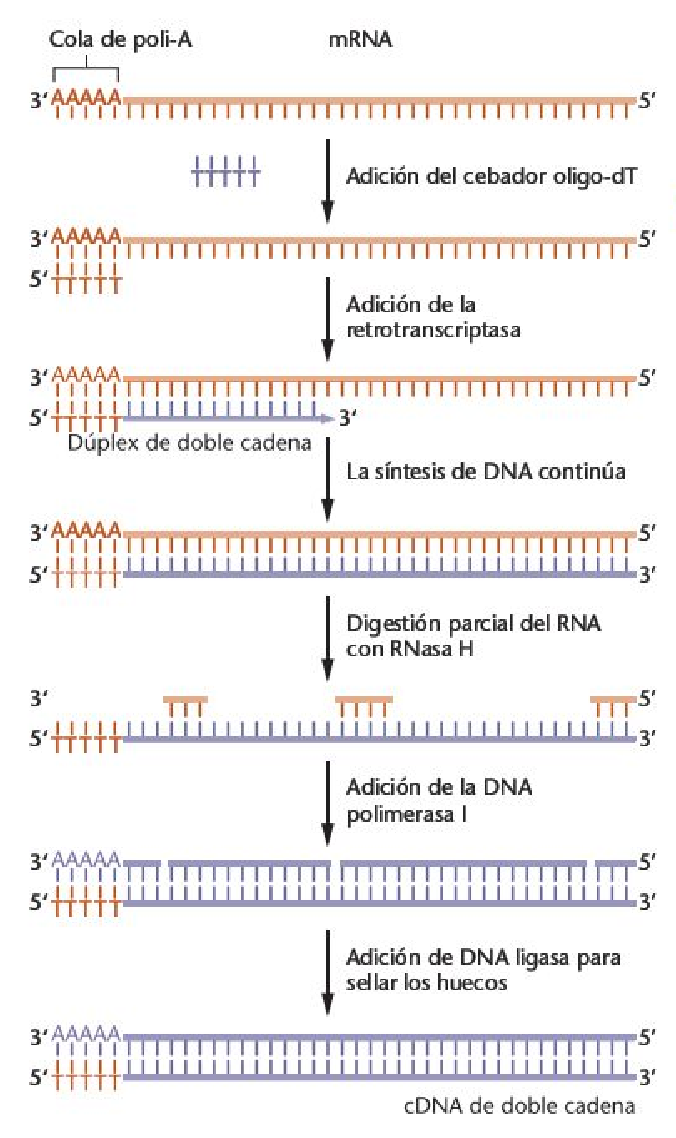


FIGURA 19.20 **Producción de cDNA a partir de mRNA.** Puesto que muchos mRNA eucarióticos tienen una cola poliadenilada (A) de longitud variable en su extremo 3′, un oligo-dT corto hibridado a ella sirve de cebador para la enzima retrotranscriptasa. La retrotranscriptasa utiliza al mRNA como molde para sintetizar una cadena de DNA complementaria (cDNA), y forma un dúplex mRNA/cDNA de doble cadena. Se digiere el mRNA con la enzima RNasa H, lo que produce huecos en la cadena de RNA. Los extremos 3′ del RNA que permanece sirven de cebadores para la DNA polimerasa, que sintetiza una segunda cadena de DNA. El resultado es una molécula de cDNA de doble cadena que se puede clonar en un vector adecuado, o puede utilizarse como sonda para rastrear una biblioteca.

cebadores aleatorios (en vez de cebadores específicos para un gen concreto) al cDNA de cadena sencilla, y tras la unión del cebador, la Taq polimerasa lo extiende, haciendo un cDNA de doble cadena. Para producir la biblioteca de cDNA, se clona el cDNA amplificado en un vector plasmídico. La RT-PCR es más sensible que la preparación convencional de cDNA, y es una herramienta poderosa para identificar mRNAs de los que pueda haber sólo una o dos copias por célula.

Ahora resuelva esto

La Pregunta 19.13 de la página 558 le pide que calcule cuantos clones son necesarios para construir una biblioteca genómica de Drosophila usando un vector plasmídico.

Sugerencia: Recuerde que en este cálculo intervienen tres parámetros: el tamaño del genoma, el tamaño medio de los insertos clonados y la probabilidad de que un gen esté incluido en la biblioteca.

19.10 Se pueden recuperar clones específicos de una biblioteca

A menudo una biblioteca genómica contiene varios cientos de miles de clones. Para encontrar un gen específico, es necesario identificar y aislar el clon o los clones que contiene ese gen. También se debe determinar si un clon concreto contiene todo el gen objeto de estudio o solo una parte de él. Hay varios métodos que permiten buscar en una genoteca para recuperar los clones de interés. La elección del método depende de las circunstancias y de la información disponible sobre el gen que se busca.

Las sondas identifican clones específicos

Para rastrear una biblioteca y recuperar clones de un gen específico se usan sondas. Una **sonda** es una secuencia de DNA o RNA que se ha marcado de alguna manera, y que es complementaria a una parte de una secuencia clonada presente en la biblioteca.

Cuando se usan en una reacción de hibridación, la sonda se une a cualquier secuencia de DNA complementaria que esté presente en uno o más clones. Las sondas se pueden marcar con isótopos radiactivos o con compuestos que permitas reacciones químicas o colorimétricas para indicar la localización de un clon específico en una biblioteca.

Las sondas pueden provenir de distintas fuentes. Incluso se pueden usar genes relacionados aislados de otras especies si se ha conservado un fragmento adecuado de la secuencia. Por ejemplo, se pueden aislar copias extracromosómicas de genes ribosómicos de la rana africana *Xenopus laevis* por centrifugación, y se pueden clonar en vectores plasmídicos. Como las secuencias de los genes ribosómicos están muy conservadas, se pueden recuperar clones que transportan genes ribosómicos humanos de una biblioteca genómica usando fragmentos del DNA ribosómico de *Xenopus* como sonda.

Si el gen que se quiere seleccionar de la biblioteca genómica se expresa en determinados tipos celulares, se puede utilizar una

sonda de cDNA. Esta técnica es especialmente útil cuando se puede obtener el mRNA de un producto génico purificado o enriquecido. Por ejemplo, el mRNA de la β-globina se encuentra en altas concentraciones en determinados estadios del desarrollo de los glóbulos rojos. Para hacer una sonda, se puede copiar el mRNA purificado de estas células a cDNA utilizando retrotranscriptasa. De hecho, para recuperar el gen estructural de la β-globina humana clonado en una biblioteca genómica se utilizó originalmente una sonda de cDNA.

Rastreo de una biblioteca

Para rastrear una *biblioteca plasmídica*, se hacen crecer los clones en placas de cultivo con agar, donde forman cientos o miles de colonias (Figura 19.21). Se hace una réplica de las colonias poniendo sobre su superficie un filtro de nylon. Esto transfiere las colonias bacterianas de la placa al filtro. Éste se procesa para lisar las células bacterianas, se desnaturaliza el DNA de doble cadena liberado por las células en cadenas sencillas, y dichas cadenas se unen al filtro.

Se rastrea el DNA del filtro incubándolo con una sonda de ácido nucleico marcada. La sonda se calienta y se enfría rápidamente para que forme moléculas de cadena sencilla, y se añade a la solución que contiene el filtro. Si alguna de las secuencias nucleotídicas del filtro es complementaria a la sonda, se formará una molécula híbrida de doble cadena (una cadena de la sonda y la otra del DNA clonado del filtro). Después incubar con la sonda, se lava el exceso de sonda no unida y se detecta la presencia de moléculas híbridas. Si se ha utilizado una sonda radiactiva, se cubre el filtro con una película de rayos X. La extinción de la radiactividad de las moléculas de sonda del filtro expondrá la película, lo que producirá manchas oscuras al revelarla. Estas manchas representan las colonias de la placa que contienen el gen clonado de interés (Figura 19.21). Usando la posición de las manchas en la película como guía, se identifica y se recupera la colonia correspondiente de la placa. El DNA clonado que contiene se puede usar en nuevos experimentos. En algunas sondas no radiactivas, una reacción química emite fotones de luz (quimioluminiscencia) que exponen una película fotográfica, y que revelan la localización de las colonias que transportan el gen de interés.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos qué clon de una biblioteca contiene el gen de interés?

Para rastrear una biblioteca fágica se utiliza un método ligeramente diferente denominado **hibridación de calvas**. Se siembra una solución de los fagos que llevan los insertos de DNA en una placa en la que está creciendo un césped de bacterias. Los fagos infectan las células bacterianas y al replicarse forman calvas. Cada calva, que aparece en la placa como una mancha clara, representa la progenie de un sólo fago y es un clon. Se transfieren las calvas a una membrana de nylon. Se rompen los fagos y se desnaturaliza el DNA del filtro en cadenas sencillas, las cuales se rastrean con una sonda marcada. Las calvas de los fagos son mucho más pequeñas que las colonias bacterianas, por lo que se pueden rastrear más calvas en un solo filtro, lo que hace que este método sea mucho más eficiente para el rastreo de bibliotecas genómicas de gran tamaño.



La Pregunta 19.18 de la página 558 implica la selección de un gen clonado de una biblioteca de cDNA.

Sugerencia: Los clones de cDNA no tienen todas las secuencias de una biblioteca genómica, pero sí tienen las secuencias codificantes, y pueden ser seleccionados con la sonda adecuada.

19.11 Las secuencias clonadas se pueden caracterizar de diversas formas

La identificación y la recuperación de secuencias de DNA mediante clonación o por PCR es una herramienta poderosa para analizar la estructura y la función de los genes. De hecho, gran parte del Proyecto Genoma Humano se basa en estas técnicas. En las siguientes secciones se considerarán algunos de estos métodos, que se usan para proporcionar información sobre la organización y la función de las secuencias clonadas.

La cartografía de restricción

Uno de los primeros pasos al caracterizar un DNA es la construcción de **mapa de restricción**. El mapa de restricción establece el número, el orden y la distancia entre los sitios de corte de enzimas de restricción a lo largo de en un segmento de DNA clonado. Generalmente, los mapas de restricción de diferentes DNAs clonados son suficientemente diferentes para servir de etiqueta de identificación de cada clon. Recuerde que las unidades de un mapa de restricción se expresan en **pares de bases (pb)** o, para distancias más largas, en **pares de kilobases (kb)**. Los mapas de restricción proporcionan información sobre la longitud del inserto clonado y sobre la localización de los sitios de corte de enzimas de restricción dentro del clon. Estos datos pueden utilizarse para subclonar fragmentos de un gen, o para comparar su organización interna con respecto a otras secuencias clonadas.

Los fragmentos generados tras cortar el DNA con enzimas de restricción pueden separarse mediante electroforesis en gel, un método que separa los fragmentos por su tamaño, y en el que los fragmentos más pequeños se mueven más rápidamente.

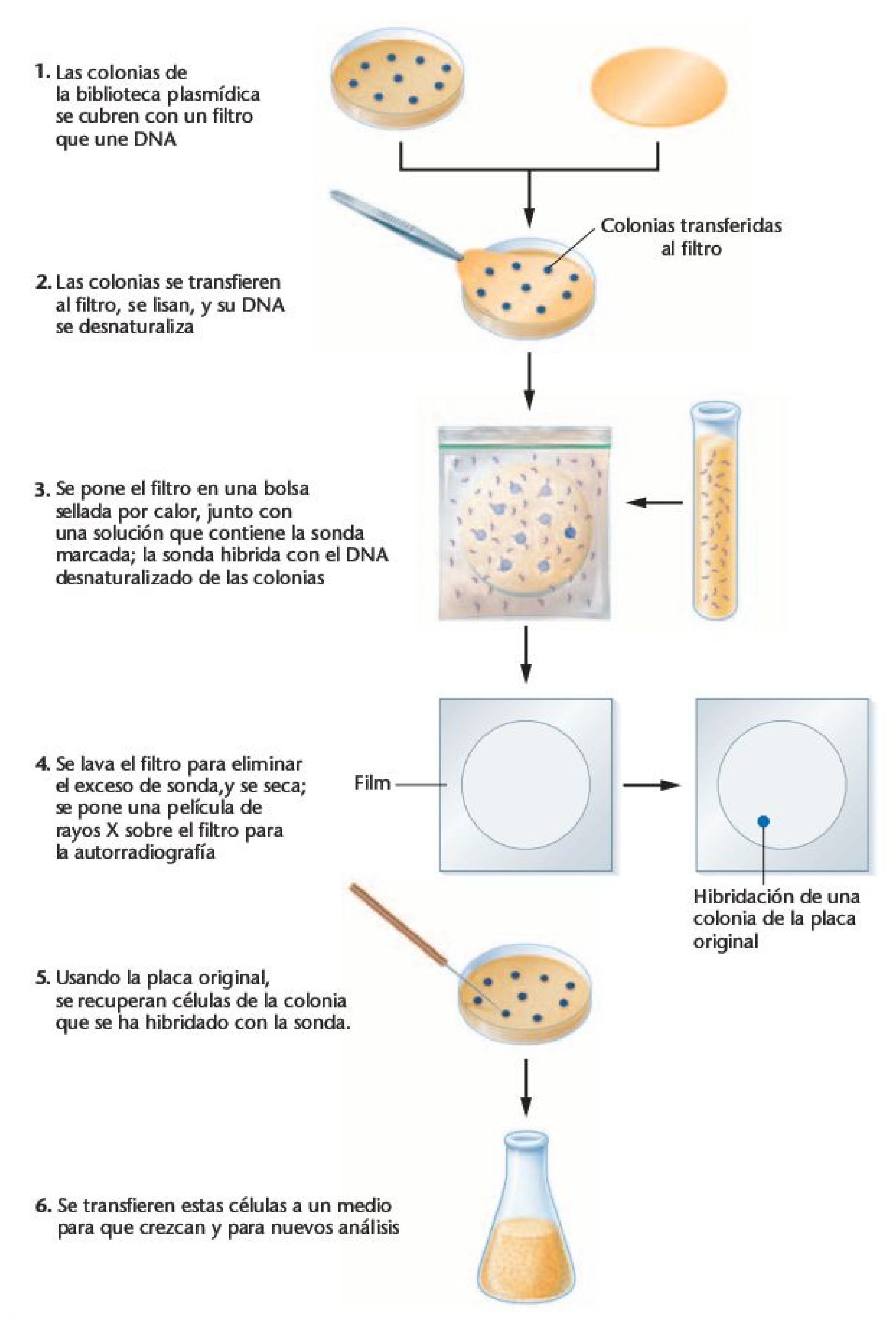


FIGURA 19.21 Rastreo de una biblioteca genómica para recuperar el gen clonado. La biblioteca, presente en bacterias en una placa de Petri, se cubre con un filtro que une DNA, y las colonias se transfieren él. Se lisan las colonias del filtro, y su DNA se desnaturaliza en cadenas sencillas. Se pone el filtro en una bolsa de hibridación, junto con un tampón y la sonda de DNA de cadena sencilla marcada. Durante la incubación la sonda forma un híbrido de doble cadena con las secuencias complementarias del filtro. Se saca el filtro de la bolsa, y se lava para eliminar el exceso de sonda. Los híbridos se detectan poniendo un trozo de película de rayos X sobre el filtro, y exponiéndola por un breve periodo de tiempo. Se revela la película, y los sucesos de hibridación se visualizan como manchas en ella. Las colonias que contienen el inserto que ha hibridado con la sonda se identifican por la orientación de las manchas. Las células se recuperan de la colonia para hacerlas crecer más y para nuevos análisis.

Los fragmentos aparecen como una serie de bandas que pueden visualizarse tiñendo el DNA con bromuro de etidio e iluminándolo con luz ultravioleta (Figura 19.22).

La Figura 19.23 muestra la construcción de un mapa restricción de un segmento de DNA clonado. Para construir el mapa, empecemos con un segmento de DNA clonado de 7 kb de longitud. Se digieren tres muestras del DNA clonado con enzimas de restricción: una con *Hin*dIII, otra con *Sal*I, y la última con las dos enzimas, *Hin*dIII y *Sal*I. Los fragmentos se separan por electroforesis en gel (que se discute en el Capítulo 10), y se tiñen con bromuro de etidio, lo que produce una serie de bandas en el gel. Para analizarlas, las bandas se fotografían o se escanean. El tamaño de los fragmentos se mide comparando su localización en el gel con un conjunto de patrones de peso molecular en carriles adyacentes. Para construir el mapa, se analizan el número y el tamaño de los fragmentos. Cuando el DNA se corta con *Hin*dIII, se producen dos fragmentos (0,8 kb y 6,2 kb), lo que confirma que el inserto clonado mide 7,0 kb y que contiene un solo sitio de restricción para esta enzima (que se localiza a 0,8 kb de uno de los extremos). Cuando el DNA se corta con *Sal*I, se producen dos fragmentos (1,2 kb y 5,8 kb), lo que indica que el inserto solo tiene un sitio de restricción para esta enzima, localizado a 1,2 kb de uno de los extremos del segmento de DNA clonado.

Estos resultados muestran que el DNA contiene una secuencia de reconocimiento de restricción para cada enzima, pero se desconoce la posición relativa de estas dos secuencias para enzimas de restricción. Con esta información, hay dos mapas posibles. En la Figura 19.23, el modelo 1 muestra la secuencia de reconocimiento de *Hin*dIII localizada a 0,8 kb de uno de los extremos, y la secuencia de reconocimiento de *Sal*I a 1,2 kb del mismo extremo. El mapa alternativo, el modelo 2, sitúa la secuencia de reconocimiento de *Hin*dIII a 0,8 kb de un extremo, y la secuencia de reconocimiento de *Sal*I a 1,2 kb del otro extremo.



FIGURA 19.22 Gel de agarosa que contiene fragmentos separados de DNA teñidos con un colorante (bromuro de etidio) y visualizados mediante iluminación con luz ultravioleta. Los fragmentos más pequeños migran más rápido y más lejos que los fragmentos más grandes, dando por resultado la distribución que se muestra.

El modelo correcto se determina analizando el resultado de la muestra digerida con *Hin*dIII y *Sal*I. El modelo 1 predice que la digestión con ambas enzimas generará tres fragmentos, de 0,4, 0,8 y 5,8 kb de longitud; el modelo 2 predice que habrá tres fragmentos, de 0,8, 5,0 y 1,2 kb. El patrón y los pesos moleculares observados en el gel tras la digestión con ambas enzimas indican que el modelo 1 es el correcto. (Véase la Figura 19.23).

Los mapas de restricción son una manera importante de caracterizar un DNA clonado, y pueden construirse sin tener ninguna otra información de ese DNA, incluyendo su capacidad codificadora y su función. Junto con otras técnicas, el cartografiado de restricción puede definir los extremos de un gen, diseccionar su organización interna y de sus regiones flanqueantes, y localizar mutaciones dentro de él.

La digestión de restricción de los clones desempeña una función importante en el cartografiado de genes en cromosomas humanos específicos y en regiones definidas de cromosomas individuales. Además, si la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción está estrechamente ligada a un alelo mutante, se puede usar esta secuencia como marcador en análisis genéticos para identificar a los portadores de enfermedades hereditarias recesivas, o para realizar un diagnóstico prenatal del genotipo fetal.

Transferencia de ácidos nucleicos

Muchas de las técnicas descritas en este capítulo se basan en la hibridación entre moléculas de ácido nucleico complementarias (DNA o RNA). Uno de los métodos más ampliamente utilizados para detectar estos híbridos es la transferencia de Southern (llamada así por su diseñador, Edward Southern). El método de **transferencia de Southern** se puede utilizar para identificar qué clones de una biblioteca contienen una determinada secuencia de DNA (como DNA ribosómico, un gen de globina, etc.) y para caracterizar el tamaño de los fragmentos, lo que permite realizar un mapa de restricción del DNA clonado. También se pueden usar para determinar si un clon contiene todo el gen o solo parte de él, y para verificar el tamaño global y la organización de la secuencia del gen o del DNA de interés. Se pueden aislar y volver a clonar los fragmentos de los clones genómicos aislados por transferencia de Southern, lo que proporciona una manera de aislar partes de un gen, incluyendo las regiones de control adyacentes y las regiones codificantes.

Esta técnica tiene dos componentes: la separación de los fragmentos de DNA por electroforesis en gel, y la hibridación de los fragmentos utilizando sondas marcadas. La electroforesis en gel caracteriza el número de fragmentos producidos mediante la digestión de restricción del DNA, y los pesos moleculares de estos fragmentos. La hibridación caracteriza las secuencias de DNA presentes en los fragmentos. El DNA a caracterizar mediante la transferencia de Southern puede provenir de diversas fuentes, incluyendo clones seleccionados de una genoteca y DNA genómico. Esta discusión incluirá ejemplos de ambos casos para mostrar cómo se usa la transferencia de Southern para caracterizar el número, el tamaño, la organización y la secuencia de los fragmentos de DNA.

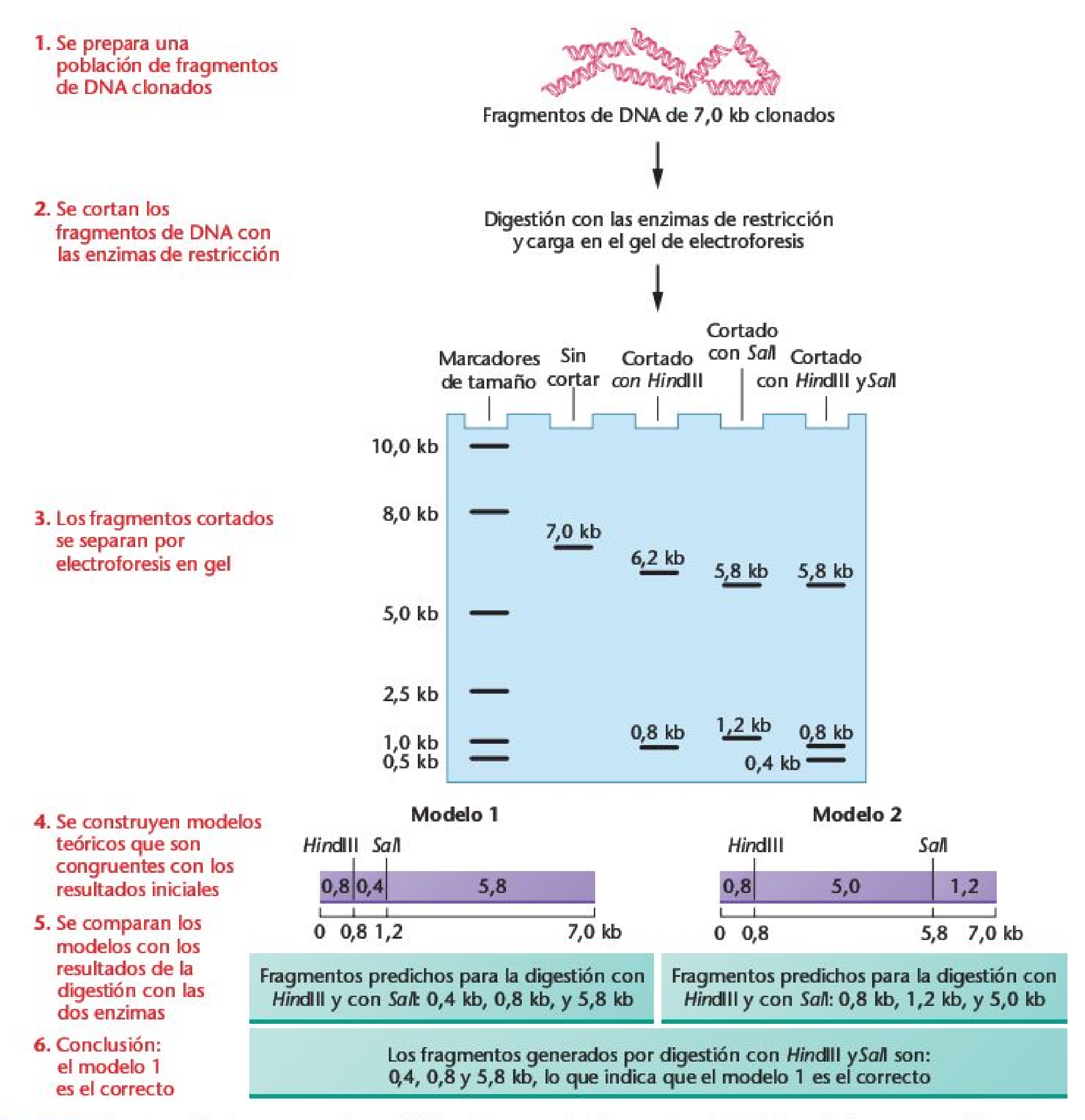


FIGURA 19.23 Construcción de un mapa de restricción. Muestras del fragmento de 7,0 kb se digieren con enzimas de restricción: una muestra se digiere con *Hind*III, otra con *Sal*I y la otra con las dos enzimas, *Hind*III y *Sal*I. Los fragmentos resultantes se separan por electroforesis en gel. Los tamaños de los fragmentos separados se miden por comparación con patrones de peso molecular en un carril adyacente. El corte con *Hind*III genera dos fragmentos: 0,8 kb y 6,2 kb. El corte con SalI produce dos fragmentos: 1,2 kb y 5,8 kb. Se construyen modelos para predecir los patrones de digestión con *Hind*II y con *Sal*I. El modelo 1 predice que la digestión con ambas enzimas producirá fragmentos de 0,4 kb, 0,8 kb y 5,8 kb. El modelo 2 predice que los fragmentos serán de 0,8 kb, 1,2 kb, 5,0 kb. La comparación de los fragmentos predichos con los observados en el gel indica que el mapa de restricción correcto es el del modelo.

Para hacer una transferencia de Southern, el DNA se corta en fragmentos con una o más enzimas de restricción, y estos fragmentos se separan por electroforesis en gel (Figura 19.24), lo que produce una serie de bandas. Se tiñe el DNA del gel, y se fotografía o se escanea para revelar el número y el peso molecular de los fragmentos de restricción. Para preparar el DNA para la hibridación posterior, éste se desnaturaliza dentro del gel en fragmentos de cadena sencilla mediante un tratamiento alcalino. Entonces se cubre el gel con una membrana que una DNA, normalmente un filtro de nitrocelulosa o de nylon. Los fragmentos de DNA del gel se transfieren a la membrana poniendo la membrana y el gel sobre un pabilo (generalmente una esponja), que se encuentra parcialmente sumergida en un tampón. Encima del filtro se ponen diversas

capas de papel absorbente, y todo el conjunto se mantiene en contacto poniendo un peso encima. La acción capilar arrastra el tampón a través del gel, transfiriendo los fragmentos de DNA a la membrana.

Después se coloca el filtro dentro de una bolsa sellada por calor junto con la sonda de DNA de cadena sencilla convenientemente marcada, para que hibride. Los fragmentos de DNA el filtro que sean complementarios a la secuencia nucleotídica de la sonda formarán híbridos de doble cadena. Se lava el exceso de sonda, y se visualizan los fragmentos hibridados en una película (Figuras 19.24 y 19.25).

En la Figura 19.25, los investigadores cortaron muestras de DNA genómico de dos cepas de *E. coli* con diversas enzimas de restricción. En la Figura 19.25(a) se muestra el patrón de fragmentos obtenido para cada enzima de restricción. En los carriles a, c y e se muestran los fragmentos de una cepa; en los carriles b, d y f se muestran los fragmentos de la otra cepa. En la Figura 19.25(b) se muestra la transferencia de Southern de este gel. La sonda hibrida solo con una banda en cada carril, y el tamaño de la banda es el mismo en ambas cepas. Estos resultados indican que ambas cepas contienen la secuencia de DNA de interés y que el patrón de restricción es muy parecido para las dos cepas.

Además de caracterizar DNAs clonados, la transferencia de Southern se puede usar para generar mapas de restricción dentro y cerca de un gen, y para identificar los fragmentos de DNA que transportan un gen o parte de él en una mezcla de fragmentos. Al comparar el patrón de bandas entre células normales y de pacientes con enfermedades genéticas o cáncer, la transferencia de Southern también detecta reordenaciones, deleciones y duplicaciones en genes asociados a estas dolencias.

Para determinar si un gen es transcripcionalmente activo en un tipo celular o tisular concreto, se puede utilizar una técnica de transferencia relacionada que detecta la presencia de mRNAs que sean complementarios a un gen clonado. Esto se lleva a cabo extrayendo mRNA de un tipo celular o tisular específico y separándolo mediante electroforesis en gel. El patrón de bandas resultante se transfiere a una membrana, como en la transferencia de Southern. Entonces el filtro se hibrida con una sonda de DNA de cadena sencilla marcada, procedente de una copia clonada del gen. Si hay mRNA complementario a la sonda de DNA, éste se detectará como una banda en la película fotográfica. Como el protocolo original (unión de DNA a un filtro) se conoce como transferencia de Southern, este procedimiento (unión de RNA a un filtro) se denomina **transferencia northern**. (Siguiendo esta lógica perversa, otro procedimiento en el que se unen proteínas a un filtro se conoce como **transferencia western**.)

La transferencia northern proporciona información sobre la expresión de genes específicos, y se usa para estudiar patrones de expresión génica en tejidos embrionarios, cáncer y enfermedades hereditarias. La transferencia northern también puede utilizarse para detectar cortes y empalmes alternativos del mRNA (múltiples tipos de transcritos derivados de un único gen), y para obtener otras informaciones sobre los mRNAs transcritos. Si se corren RNAs marcadores de tamaño conocido en un carril adyacente, se puede usar la transferencia northern para medir el tamaño del mRNA transcrito de un gen. Además, la cantidad de RNA transcrito presente en un tipo celular está relacionado con la densidad de la banda de RNA de la película fotográfica. De este modo, la transferencia northern caracteriza y cuantifica la actividad transcripcional de los genes en células, tejidos y organismos diferentes.

19.12 La secuenciación de DNA es la manera definitiva de caracterizar un clon

En cierto sentido, un DNA clonado o un DNA cualquiera, desde un clon hasta un genoma, no está completamente caracterizado hasta que se conoce su secuencia nucleotídica. La capacidad de secuenciar DNA ha permitido grandes avances en el conocimiento de la organización del genoma y de los genes, incluyendo se estructura, función y mecanismos de regulación.

El método más utilizado para secuenciar DNA fue desarrollado por James Sanger y sus colaboradores. En este procedimiento, la molécula de DNA cuya secuencia se quiere determinar se convierte en sus cadenas sencillas, que son usadas de molde para sintetizar una serie de cadenas complementarias. Cada una de estas cadenas termina aleatoriamente en un nucleótido específico diferente (Figura 19.26). Esto produce una serie de fragmentos de DNA que se separan electroforéticamente, y cuyo análisis revela la secuencia de DNA. En el primer paso de esta reacción, se calienta el DNA para que se desnaturalice y forme cadenas sencillas. El DNA de cadena sencilla se mezcla con cebadores que hibridan al extremo 3′ este DNA. Las muestras de DNA de cadena sencilla unido al cebador se distribuyen en cuatro tubos. En el siguiente paso, se añade a cada tubo la DNA polimerasa y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Además, cada tubo recibe también una pequeña cantidad de un desoxirribonucleótido modificado, denominado dideoxidonucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). Los dideoxidonucleótidos tienen un grupo 3′ –H en lugar de un grupo 3′ –OH. Para poder analizar la secuencia, uno de los desoxirribonucleótidos o el cebador está marcado radiactivamente. Se añade DNA polimerasa a cada tubo, y el cebador se elonga en dirección 5′–3′, formándose una cadena complementaria al molde.

Al producirse la síntesis de DNA, ocasionalmente la DNA polimerasa inserta un dideoxidonucleótido en lugar de un desoxirribonucleótido a la cadena de DNA en crecimiento. Puesto que el dideoxidonucleótido no tiene un grupo 3′ –OH, no puede formar un enlace 3′ con ningún otro nucleótido, y la síntesis de DNA se detiene. Por ejemplo, en el tubo al que

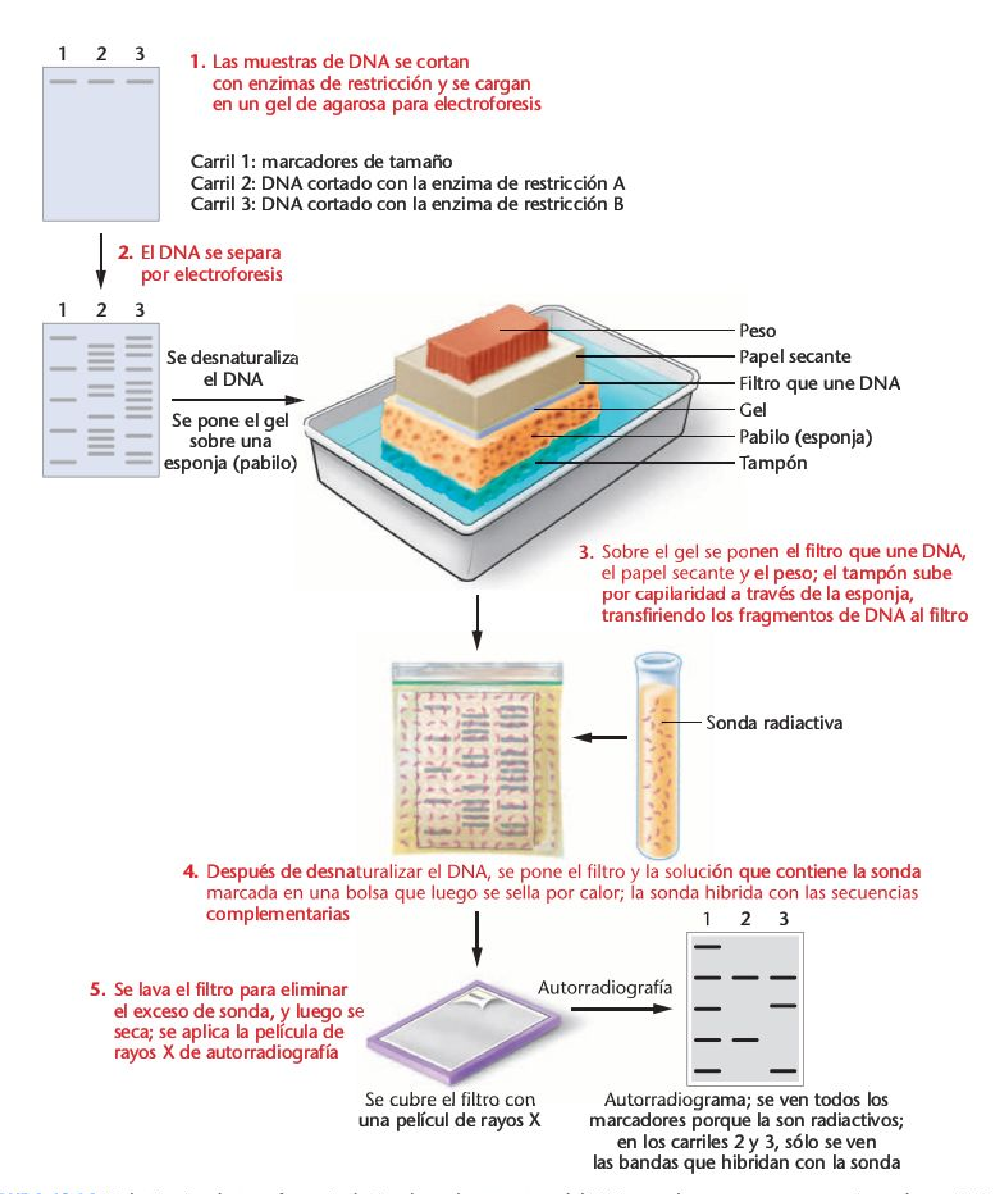


FIGURA 19.24 En la técnica de transferencia de Southern, las muestras del DNA a analizar se cortan con enzimas de restricción y los fragmentos se separan por electroforesis en gel. El patrón de fragmentos se visualiza y se fotografía tiñendo el gel con bromuro de etidio e iluminándolo con luz ultravioleta. Entonces se pone el gel sobre una esponja (pabilo) que está en contacto con una solución tamponadora y se cubre con un filtro que une DNA. Se colocan varias capas de papel de celulosa secante encima del filtro y se mantienen presionadas con un peso. La acción capilar arrastra el tampón por el gel, transfiriendo el patrón de fragmentos de DNA del gel al filtro. Los fragmentos de DNA del filtro se desnaturalizan en cadenas sencillas y se hibridan con una sonda marcada. Se lava el filtro para eliminar el exceso de sonda, y se cubre con un trozo de película de rayos X de autorradiografía. Los fragmentos hibridados se muestran como bandas en la película de rayos X.

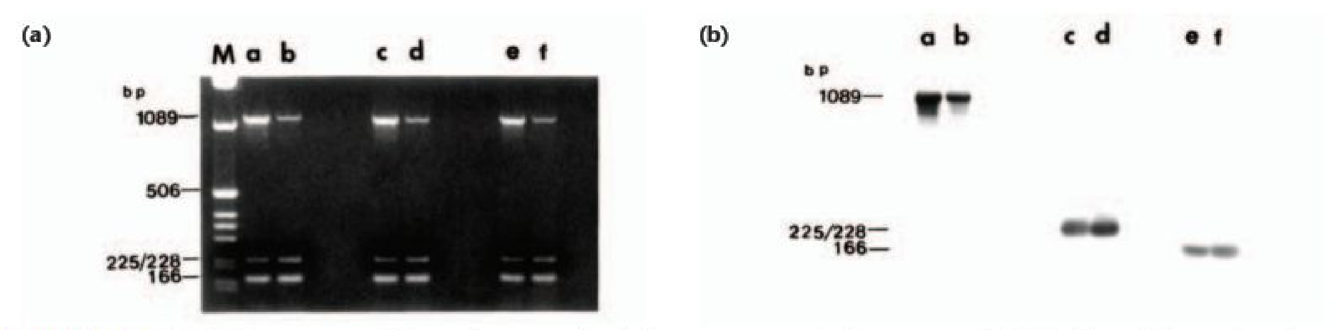


FIGURA 19.25 (a) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para mostrar los fragmentos de DNA. El carril M contiene los marcadores de tamaño. Los carriles a, c y e contienen DNA de una cepa bacteriana de *E. coli,* y los carriles b, d y f contienen DNA de otra cepa. (b) Transferencia de Southern preparada a partir del gel de (a). Sólo hibridan las bandas que contienen secuencias complementarias a la sonda. Ambas cepas contienen la secuencia de la sonda, y no pueden distinguirse entre sí con esta prueba. Los marcadores de tamaño no eran radiactivos, y no se ven en la transferencia de Southern.

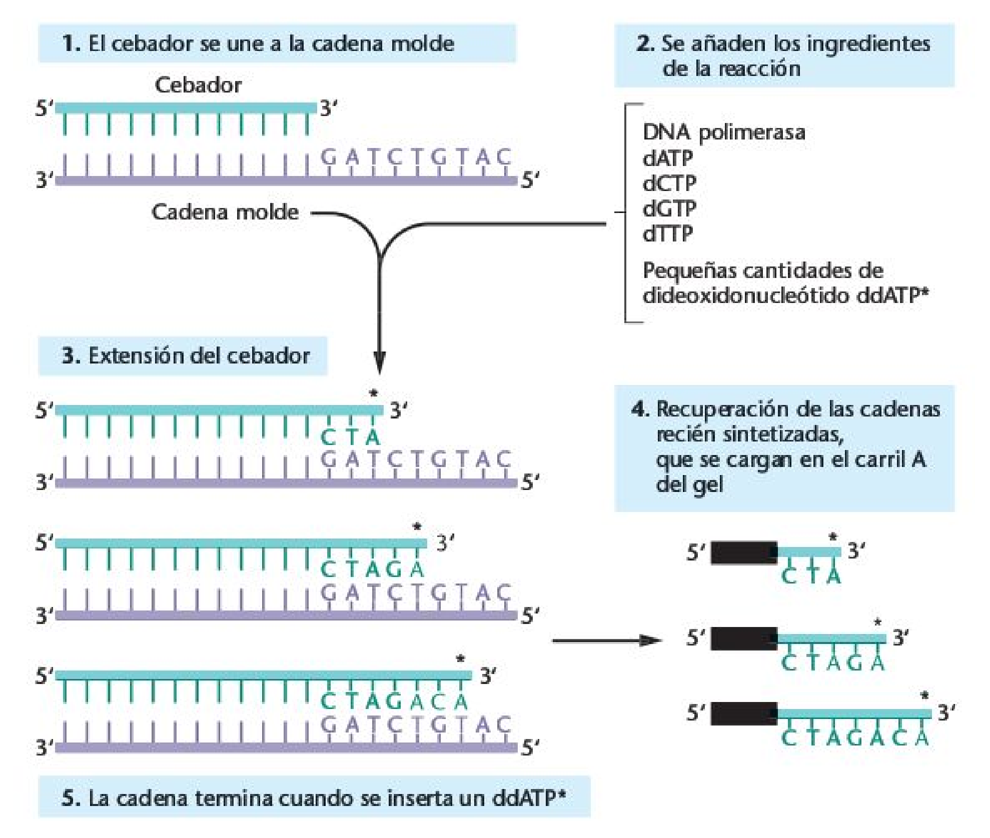


FIGURA 19.26 Secuenciación de DNA usando el método de terminación de la cadena. (1) Se hibrida un cebador a la secuencia adyacente al DNA a secuenciar (generalmente en el sitio de inserción al vector de clonación). (2) Se añade la mezcla de reacción a la combinación cebador-molde. Esta mezcla incluye la DNA polimerasa, los cuatro dNTPs (uno de los cuales está marcado radioactivamente) y una pequeña cantidad de un dideoxinucleótido. Se utilizan cuatro tubos, cada uno de los cuales contiene un dideoxinucleótido diferente (ddATP, ddCTP, etc.). (3) Durante la extensión del cebador, ocasionalmente la polimerasa inserta un ddNTP en lugar de un dNTP, terminándose la síntesis de la cadena porque el ddNTP no tiene el grupo 3′-OH necesario para unir el siguiente nucleótido. En la figura, el ddATP y la A insertada de este dideoxidonucleótido están marcados con un asterisco. Durante la reacción, todos los sitios posibles de terminación tendrán un ddNTP insertado. (4) Las cadenas recién sintetizadas se separen del molde, y la mezcla se carga en un gel. Los fragmentos del tubo de reacción que contenía ddATP y que terminan en A se cargan en el carril A, los que terminan en C en el carril C, etcétera.

se ha añadido ddATP, la polimerasa inserta ddATP en vez de dATP, lo que causa la terminación de la elongación de la cadena (Figura 19.26). En los otros tubos, las reacciones terminan en una C, una G o una T respectivamente. Los fragmentos de DNA de cada tubo de reacción (uno para cada dideoxidonucleótido) se separan en carriles adyacentes mediante electroforesis en gel. El resultado es una serie de bandas que forman un patrón en escalera que se visualiza revelando la película expuesta al gel (Figura 19.27). La secuencia de nucleótidos se lee directamente desde la base hasta la parte superior del gel, lo que corresponde a la secuencia 5′-3′ de la cadena de DNA complementaria al molde[2].

FIGURA 19.27 Gel de secuencia de DNA que muestra la separación de los fragmentos recién sintetizados en las cuatro reacciones de secuenciación (una por carril). Para obtener la secuencia de bases del fragmento de DNA, el gel se lee desde la base, empezando por la banda más baja sea cual fuere su carril, después la siguiente, etcétera. Por ejemplo, la secuencia del DNA de este gel empieza con %′-TT en parta inferior del gel, y prosigue hacia arriba como 5′-TTAACCCGG, etcétera.

La secuenciación de DNA en los proyectos de secuenciación del genoma a gran escala se ha automatizado, y utiliza máquinas que pueden secuenciar varios cientos de miles de nucleótidos cada día. En este procedimiento, se marca cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos análogos con un colorante fluorescente de diferente color (Figura 19.28), de manera que las cadenas que terminan en adenosina están marcadas con un color, las que terminan en citosina con otro, etcétera. Si añaden los cuatro dideoxidonucleótidos marcados a un mismo tubo, y tras la extensión del cebador realizada por la DNA polimerasa, los productos de la reacción se cargan en un carril de un gel. El gel es rastreado por un láser, lo que provoca que cada banda emita fluorescencia de un color diferente. La máquina de secuenciación tiene un detector que lee el color de cada banda, y determina si representa una A, una T, una C o una G. Estos datos se representan en forma de picos coloreados, correspondiendo cada una a un nucleótido en la secuencia (Figura 19.29).

La secuenciación de DNA y los proyectos Genoma

La secuenciación de DNA es el núcleo central de los proyectos Genoma. Utilizando una combinación de técnicas de DNA recombinante y de secuenciación de nucleótidos, se ha secuenciado ya el genoma de más de 100 especies de procariotas, y hay varios centenares de proyectos más en desarrollo. El Proyecto Genoma Humano, financiado por el Departamento de Energía y el Instituto Nacional de Salud, junto con el proyecto privado financiado por la compañía de biotecnología Celera, usaron una combinación de bibliotecas genómicas y de bibliotecas específicas de cromosoma para terminar, el año 2003, la secuenciación de la porción codificante del genoma humano. Utilizando la tecnología de secuenciación de DNA, ya se han terminado también los proyectos genoma de otras muchas especies de eucariotas, y hay varias docenas más en proceso.

Seminario Web 19.6 Secuenciación de DNA

[2] *Nota del traductor:* puesto que durante la reacción de secuenciación se producen muchas copias de una misma cadena molde, en cada una de ellas la reacción terminará de forma aleatoria en una A diferente de la secuencia (o en una C, G o T, dependiendo del tubo de reacción). Por eso, al analizar la electroforesis en gel, cada cadena terminada en un nucleótido específico formará una banda, lo que generará el patrón en escalera y permitirá leer directamente la secuencia.

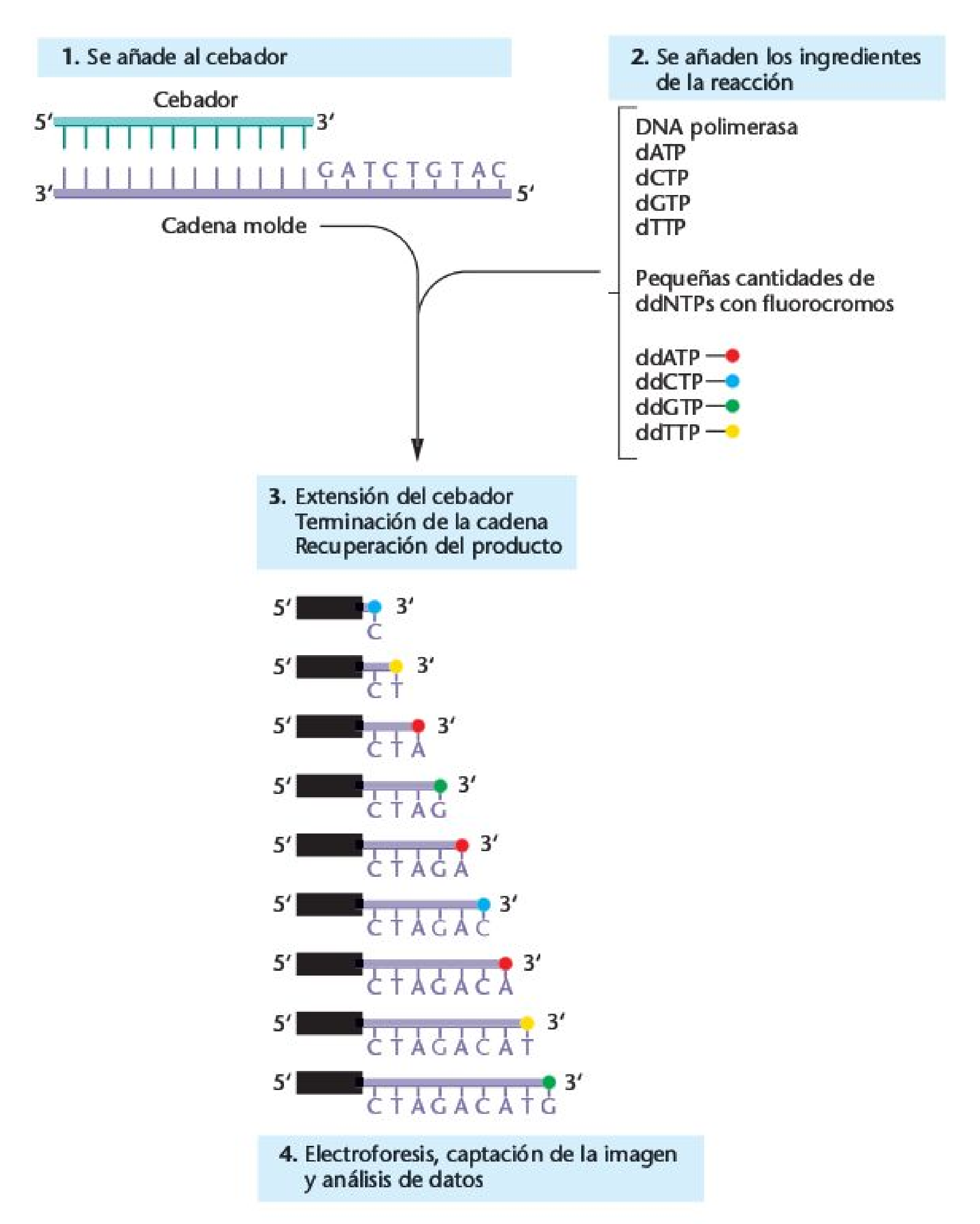


FIGURA 19.28 En la secuenciación de DNA usando dideoxidonucleótidos marcados con colorantes fluorescentes, se añaden los cuatro ddNTPs al mismo tubo, y durante la extensión del cebador se producen todas las combinaciones de moléculas. Los productos de la reacción se cargan en un solo carril del gel, y las bandas son leídas por un sistema de detección y captación de imagen. Actualmente este proceso está automatizado, y las máquinas robotizadas, como las usadas en el Proyecto Genoma Humano, secuencia varios centenares de miles de nucleótidos en un periodo de 24 horas, y después almacenan y analizan los datos de forma automática. La secuencia obtenida es la extensión del cebador, y se lee de la cadena recién sintetizada, no de la cadena molde. Así, la secuencia obtenida empieza por 5′-CTAGACATG.

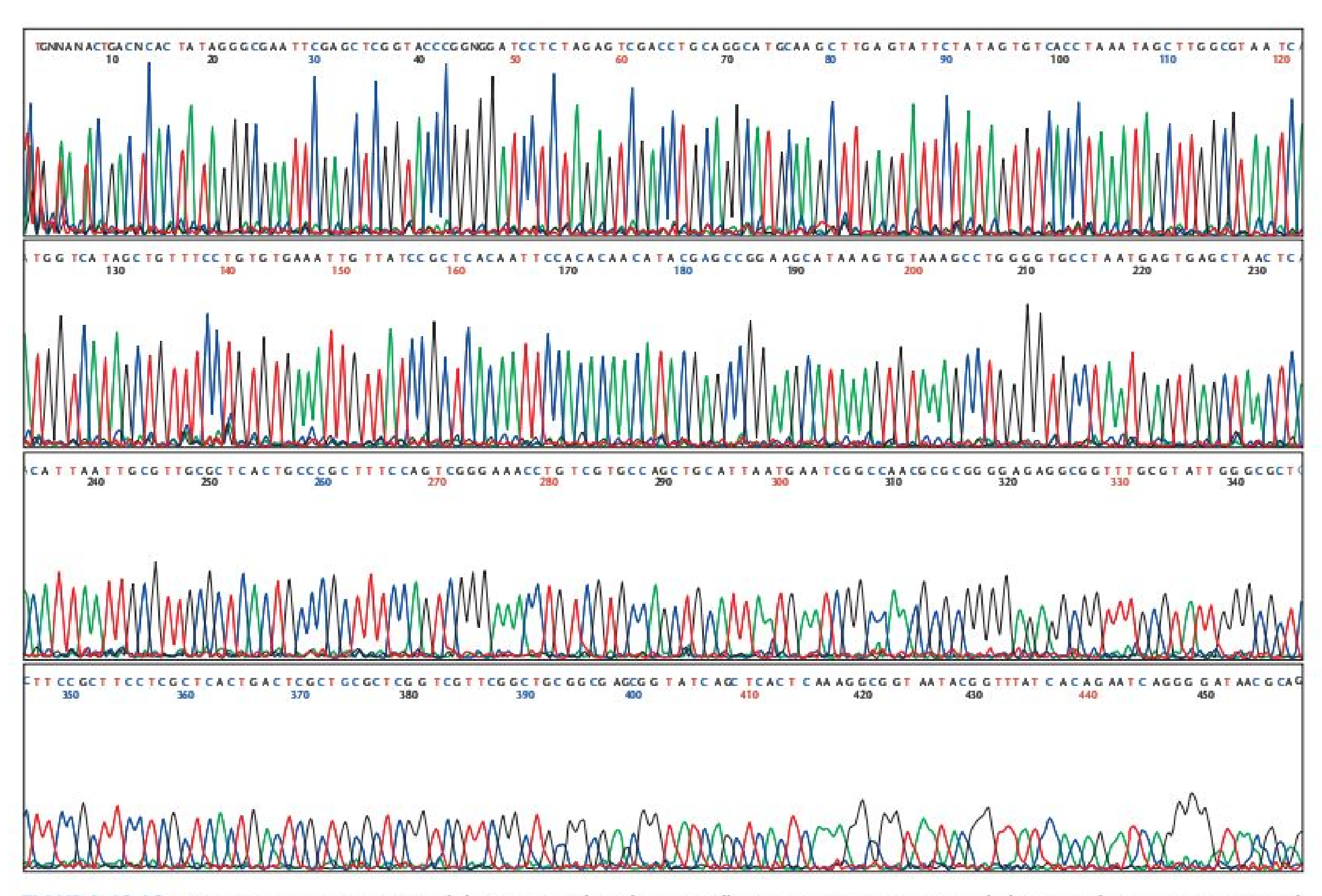


FIGURA 19.29 Secuenciación automática del DNA usando colorantes fluorescentes, uno para cada base. Cada pico representa el nucleótido correcto de la secuencia. La secuencia del cebador se localiza a la izquierda de las bases en la parte superior izquierda de la figura, y no se muestra en esta imagen. Las bases marcadas como N son ambiguas, y no pueden identificarse con certeza. Estas lecturas ambiguas son más frecuentes cerca del cebador, porque la calidad de la determinación de la secuencia se deteriora más cuanto más cerca del cebador. Las bases separadas se leen en orden a lo largo del eje, de izquierda a derecha. Así, esta secuencia empieza como 5′-TGNNANACTGCNCAC. Los números debajo de las bases indican la longitud de la secuencia en pares de bases.

Resumen del capítulo

1. La piedra angular de la tecnología del DNA recombinante es un tipo de enzimas, denominadas enzimas de restricción, que cortan el DNA por secuencias de reconocimiento específicas. Los fragmentos producidos se unen a vectores de DNA para formar moléculas de DNA recombinante.
2. Los vectores se replican autónomamente en las células huésped, y facilitan la manipulación de las moléculas de DNA recién generadas. Los vectores se han construido a partir de diversas fuentes, que incluyen plásmidos bacterianos y fagos.
3. Las moléculas de DNA recombinante se transfieren a un huésped, y durante la replicación de la célula huésped se producen copias clónicas. Se han utilizado diversas células huésped para la replicación, incluyendo bacterias, levadura y células de mamífero. Las copias clonadas de las secuencias de DNA exógeno se recuperan, se purifican y se analizan.
4. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para amplificar una secuencia de DNA específica que se encuentre presente en una colección de secuencias de DNA, como DNA genómico. El método de PCR permite clonar DNA sin necesidad de células huésped, y es un método rápido y sensible con una amplia gama de aplicaciones.
5. Una vez clonadas, las secuencias de DNA se analizan utilizando diversos métodos, como el cartografiado de restricción y la secuenciación de DNA. Otros métodos, como la transferencia de Southern, utilizan la hibridación para identificar los genes y las regiones reguladoras flanqueantes en las secuencias clonadas.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Huellas moleculares del DNA y medicina forense: el caso del palo verde

La utilización del análisis de DNA en medicina forense hace cada vez más difícil librarse de muchos crímenes. Actualmente es una cosa sencilla aislar DNA de un tejido dejado en el escenario de un crimen, de una mancha de sangre, de restos de piel dejados bajo las uñas de la víctima, e incluso de las células que hay pegadas en la base de un folículo piloso. Se pueden usar diversas técnicas para determinar la probabilidad de que una muestra provenga de un sospechoso del caso. En estos últimos años, la medicina forense ha utilizado cada vez más la técnica de PCR, tanto porque es rápida (unas pocas horas) como porque sólo precisa una pequeña muestra de DNA (un nanogramo aproximadamente). Una variante del método de PCR que puede ser especialmente valiosa es la denominada amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD, del inglés *random amplified polymorphic DNA*, y que se pronuncia «rápid»). Bajo las condiciones adecuadas, el procedimiento de RAPD genera un perfil de DNA que es único para cada individuo, y que por eso puede usarse para la identificación personal.

El procedimiento de RAPD implica la amplificación de un conjunto de fragmentos de DNA de secuencia desconocida. Primero, se mezcla un cebador de amplificación con la muestra de DNA. El cebador se hibridará con todos los sitios de la muestra de DNA que tengan una secuencia complementaria. Para cebadores de 10 nucleótidos de longitud, la unión se producirá en unos pocos miles de sitios repartidos aleatoriamente por el genoma humano. Cuando los cebadores se unen a sitios del DNA no muy alejados (dentro de unos 2000 nucleótidos de distancia), se produce la amplificación del DNA que hay entre estos sitios, lo que eventualmente produce cientos de millones de copias de la secuencia de DNA que hay entre cada uno de ellos. Cuando los productos de esta reacción se separan en una electroforesis en un gel de agarosa, cada segmento de DNA amplificado aparecerá como una banda distinta. La localización de los sitios de unión de los cebadores en el genoma será probablemente diferente entre dos personas cualesquiera de la población, debido a diferencias menores en la secuencia del DNA (p.e., cambios de bases, inserciones y deleciones). Puesto que esto afecta la unión inicial de los cebadores, el número y la localización de las bandas de DNA en el gel variarán de una persona a otra. El perfil de DNA resultante se conoce como huella molecular del DNA, y representa una «instantánea» característica del genoma de una persona, lo que permite distinguirla de otras personas de la población.

El hecho que el perfil de DNA de un tejido encontrado en el escenario de un crimen encaje con el de un sospechoso, no prueba que el tejido pertenezca al sospechoso; en cambio, excluye a todos los que tienen un patrón diferente. Por lo tanto, la estrategia es generar cinco o más perfiles de DNA de una misma muestra utilizando diversos cebadores de amplificación. Cuantos más perfiles encajen entre la muestra y el sospechoso, más improbable es que las muestras del escenario del crimen provengan de una persona diferente al sospechoso. Se puede calcular la probabilidad de que la concordancia completa de todos los patrones de bandas se hayan producido simplemente por casualidad, lo que da, por ejemplo, una probabilidad de 1 en 100.000 o de 1 en 1.000.000 de una «concordancia aleatoria».

Una de las utilizaciones más interesantes de las huellas moleculares del DNA en un caso criminal no implicó al DNA del sospechoso, sino al DNA de unas plantas encontradas en el escenario del crimen. La noche del 2 de mayo de 1992, una mujer de Phoenix fue estrangulada y su cuerpo fue arrojado cerca de una fábrica abandonada, en el desierto circundante. La policía descubrió un busca cerca del cuerpo, haciendo de su propietario el principal sospechoso del asesinato. Cuando se le interrogó, el sospechoso admitió haber estado con la mujer el día del asesinato, pero dijo que nunca había estado cerca de la fabrica y sugirió que la mujer debería haberle robado el busca de su camioneta, un «*pick-up*». Una búsqueda en la camioneta proporcionó la pista principal que situaba al sospechoso en la fábrica: en la parte trasera de la camioneta había dos vainas de semillas de palo verde.

El palo verde *(Cercidium floridum)*, un miembro de la familia de las judías, es una planta poco común nativa de los desiertos del sudoeste de los EEUU. Bien adaptado al clima seco y caluroso, tiene pequeñas hojas. Para compensarlo, sus tallos son verdes y realizan fotosíntesis. Esta adaptación le da nombre a la planta: palo verde. La planta no se parece a las judías en algunos aspectos pero, como una judía típica, produce semillas en vainas que caen al suelo al madurar.

Los investigadores del homicidio asignados al caso se preguntaron si podía probarse que las vainas encontradas en la caja de la camioneta habían caído de uno de los palo verdes cercanos al sitio donde se había encontrado el cuerpo. Si fuese así, sería una buena prueba, que colocaría al sospechoso en el escenario del crimen. Pero, ¿cómo podía demostrarse? Los investigadores contactaron con el Dr. Timothy Helentjaris, por aquel entonces en la Universidad de Arizona, cerca de Tucson. Helentjaris procedió a determinar si el perfil de DNA de las vainas de la caja de la camioneta encajaban con las de los palo verdes del escenario del crimen. Helentjaris sabía que, para que la concordancia fuese significativa, primero tenía que demostrar que los palos verdes muestran variación genética entre ellos. De otra manera, sería imposible asignar sin ambigüedades una vaina dada a un arbusto concreto. Afortunadamente, encontró diferencias considerables en las huellas moleculares del DNA entre las distintas plantas de palo verde.

Entonces dieron a Helentjaris las dos vainas de semillas de la camioneta del sospechoso junto con 12 vainas más recogidas de los 12 palo verdes presentes en las inmediaciones de la fábrica. Los investigadores sabían cuál de los 12 arbustos era la clave del escenario del crimen, pero no se lo dijeron a Helentjaris. Helentjaris extrajo DNA de todas las vaina y realizó reacciones RAPD utilizando un cebador de amplificación que había encontrado que producía huellas moleculares reproducibles de 10 a 15 bandas distintas. Los resultados de este experimento «a ciegas» fueron inconfundibles: el patrón de una de las vainas encontradas en la camioneta encajaba exactamente con sólo uno de los 12 arbustos, el más cercano al

sitio donde fue hallado el cuerpo. En una prueba adicional importante, Helentjaris encontró que este patrón era diferente al de vainas recogidas de 18 arbustos localizados en sitios aleatorios de Phoenix. En conjunto, el análisis realizado por Helentjaris permitió estimar que la probabilidad de una concordancia aleatoria era de un poco menos de 1 en 1.000.000.

El análisis de Helentjaris fue admitido como prueba en el juicio, lo que permitió situar al sospechoso en la escena del crimen. Al final del juicio, que duró cinco semanas, al sospechoso fue encontrado culpable de asesinato en primer grado. Su condena se mantuvo tras una apelación, y actualmente cumple cadena perpetua sin posibilidad de libertad condicional.

Bibliografía

Ayala, F.J., and Black. B. 1993. Science and the courts. *Am. Sci.* 81:230–39.

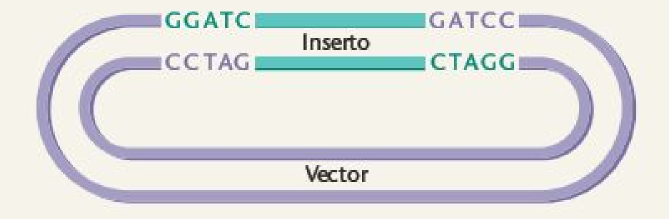
Krawczak, M., and Schmidtke, J. 1994. *DNA fingerprinting*. Oxford: BIOS Scientific.

Marx, L. 1988. DNA fingerprinting takes the witness stand. *Science* 240:1616–18.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. La secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *Sau3*A es GATC (Figura 19.2); la secuencia de reconocimiento de la enzima *Bam*HI es GGATCC, en el que las cuatro bases internas son idénticas al sitio de *Sau3*A. Esto significa que los extremos de cadena sencilla producidos por las dos enzimas son idénticos. Suponga que tiene un vector de clonación que contiene un sitio *Bam*HI, y un DNA exógeno que ha cortado con *Sau3*A. (a) ¿Puede ligarse este DNA en el sitio BamHI del vector, y si es así, por qué? (b) ¿El segmento de DNAS clonado en esta secuencia puede cortarse del vector usando *Sau3*A? ¿Y con *Bam*HI? ¿Qué problemas potenciales puede prever si una *Bam*HI?

Solución: (a) El DNA cortado con *Sau3*A puede ligarse en el sitio *Bam*HI del vector puesto que los extremos de cadena sencilla generados por las dos enzimas son idénticos. (b) El DNA pude cortarse del vector con *Sau3*A porque a ambos lados del inserto se mantiene la secuencia de reconocimiento para esta enzima (GATC). En el vector ligado, las secuencias que se conservan son GGATC (izquierda) y GATCC (derecha). Sólo el 25 por ciento de las veces *seguirá* la base correcta (para producir GGATTC a la izquierda), y sólo el 25 por ciento de las veces *precederá* la base correcta (y que producirá GGATCC a la derecha). Así, *Bam*HI podrá cortar el inserto del vector sólo el 6 por ciento de las veces ($0{,}25 \times 0{,}25 = 0{,}0625$).



2. Al preparar una reacción de PRC, ¿qué conjunto de cebadores elegiría para amplificar las secuencias que se muestran como una serie de asteriscos?

5′-TTAAGATCCGTTACGTATGC * * * * * *
AACCCGTTCCTACGAACCTT-3′

3′-AATTCTAGGCAATGCATACG * * * * * *
TTGGGCAAGGATGCTTGGAA-5′

Cebadores:

Grupo 1: 5′-TTAAGATCCGTT-3′ 5′-CGTTCCTACGAA-3′

Grupo 2: 5′-GATCCGTTACGT-3′ 5′-TTCGTAGGAACG-3′

Grupo 3: 5′-CGTATGCATTGC-3′ 5′-TTCCAAGCATCC-3′

Solución: Una reacción de PCR precisa dos cebadores, uno para cada cadena. Los cebadores son complementarios a las secuencias cercanas al extremo 3′ de cada DNA de cadena sencilla. En el primer paso de la PCR, se calienta el DNA a copiar para que se separe en sus cadenas sencillas. Entonces los cebadores hibridan a las cadenas sencillas, y al añadir la polimerasa Taq se elongan en dirección 5′→ 3′. El único conjunto de cebadores que hibridará adecuadamente es el Grupo 2. Uno de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 4 pares de bases en el extremo 3′ de la cadena de DNA inferior, y el otro cebador tiene una secuencia complementaria de 4 pares de bases en el extremo 3′ de la cadena de DNA superior.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. ¿Qué funciones desempeñan las enzimas de restricción, los vectores y las células huésped en los estudios de DNA recombinante?
2. ¿Por qué el oligo-dT es un cebador efectivo de la transcriptasa reversa?
3. El gen de la insulina humano contiene varios intrones. A pesar del hecho que las células bacterianas no pueden eliminar los intrones del mRNA, explique cómo se puede clonar un gen como éste en una célula bacteriana para producir insulina.
4. Las enzimas de restricción reconocen secuencias palindrómicas en moléculas de DNA intactas y cortan la hélice de doble cadena en estas secuencias. Considerando que las bases se encuentran en el interior de la doble hélice, ¿cómo se lleva a cabo este reconocimiento?

5. Aunque los beneficios potenciales de la clonación en plantas superiores son obvios, el desarrollo en este campo va rezagado respecto a la clonación en bacterias, levadura y células de mamífero. ¿Qué razones encuentra para ello?
6. Al secuenciar el DNA de un segmento clonado, se recupera la secuencia nucleotídica que se muestra a continuación. ¿Contiene este segmento un sitio de reconocimiento palindrómico para enzimas de restricción? ¿Cuál es la secuencia de doble cadena de este palíndromo? ¿Qué enzima cortaría por este sitio? (Consulte la lista de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de la Figura 19.2.)

CAGTATCCTAGGCAT

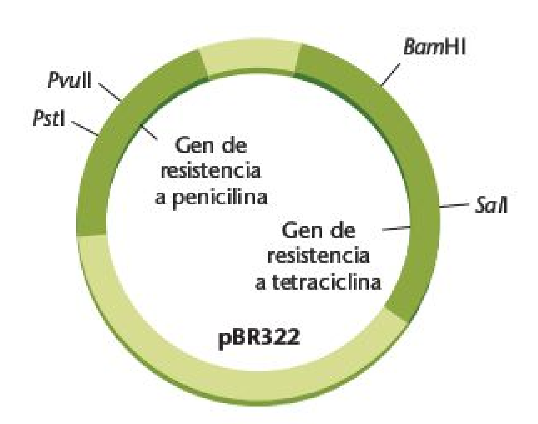
7. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción son palindrómicas; es decir, se lee lo mismo en ambas cadenas de DNA en dirección 5′-3′. ¿Cuál es la ventaja de tener secuencias de reconocimiento de restricción organizadas de esta manera?
8. Enumere las ventajas y las desventajas de usar plásmidos y YACs como vectores de clonación.
9. A continuación se muestran diversas enzimas de restricción con secuencias de reconocimiento de cuatro y seis bases. Para cada una de estas enzimas, asumiendo una distribución aleatoria de nucleótidos y cantidades iguales de todos ellos en el DNA a cortar, ¿qué distancia hay de promedio entre estas secuencias de reconocimien?

*Taq*I	TCGA	*Hind*III	AAGCTT
*Alu*I	AGCT	*Bal*I	TGGCCA
*Hae*III	GGCC	*Bam*HI	GGATCC

10. Algunas enzimas de restricción tienen secuencias de reconocimiento que son específicas y sin ambigüedades, mientras que otras secuencias de reconocimiento presentan ambigüedades, de manera que una posición determinada dentro del sitio de corte puede estar ocupada por cualquier purina, por cualquier pirimidina o por cualquier nucleótido. En los siguientes ejemplos, *Not*I tiene una secuencia de reconocimiento sin ambigüedades, *Hinf*I tiene una secuencia ambigua (N = cualquier nucleótido), y *Xho*II también tiene una secuencia de reconocimiento ambigua (Pu 0 cualquier purina, y Py = cualquier pirimidina). Suponiendo que en el DNA a cortar los nucleótidos se encuentran distribuidos aleatoriamente y en cantidades iguales, ¿qué distancia hay de promedio entre estas secuencias de reconocimiento de restricción?

*Not*I	GCGGCCGC
*Hinf*I	GANTC
*Xho*II	PuGATCPy

11. ¿Cuáles son las ventajas de usar una enzima de restricción con relativamente pocas secuencias de reconocimiento? ¿Cuándo utilizaría una enzima como ésta?
12. Un plásmido resistente a ampicilina y a tetraciclina, pBR322, se corta con *Pst*I, que corta dentro del gen de resistencia a ampicilina. El plásmido cortado se liga con un DNA de *Drosophila* digerido con *Pst*I para preparar una biblioteca genómica, y la mezcla se utiliza para transformar *E. coli* K12. (a) ¿Qué antibiótico debe añadirse al medio para seleccionar las células que han incorporado el plásmido? (b) ¿Qué patrón de resistencia a antibióticos debería seleccionarse para obtener plásmidos que contengan los insertos de *Drosophila*? (c) ¿Cómo se puede explicar la presencia de colonias que sean resistentes a ambos antibióticos?



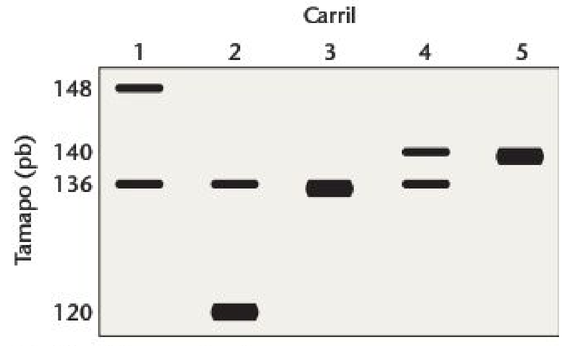
13. Se encuentra con que los plásmidos aislados de los clones del Problema 12 tienen un inserto cuya longitud es, de media, de 5 kb. Dado que el genoma de *Drosophila* tiene $1{,}5 \times 10^5$ kb de longitud, ¿cuántos clones serían necesarios para tener una probabilidad del 99 por ciento de que esta biblioteca contuviese todas las secuencias genómicas?
14. En un experimento control, un plásmido que contiene una secuencia de reconocimiento de *Hind*III dentro de un gen de resistencia a kanamicina se corta con esta enzima, se vuelve a ligar, y se utiliza para transformar células de *E. coli* K12. Se seleccionan las colonias resistentes a kanamicina, y su DNA plasmídico se somete a electroforesis. La mayoría de las colonias contienen plásmidos que producen una sola banda que migra a la misma velocidad que el plásmido intacto original. Unas pocas colonias, sin embargo, producen dos bandas, una del tamaño original, y otra mucho más grande. Esquematice el origen de esta banda lenta como un producto de la ligación.
15. Acaba de generar la primera biblioteca genómica del mundo de okapi africano, un pariente de la jirafa. Todavía no se ha descrito ni aislado ningún gen de este genoma. Desea aislar el gen que codifica la proteína β-globina transportadora de oxígeno de la biblioteca de okapi. Este gen ya se ha aislado en humanos, y su secuencia nucleotídica y aminoacídica se encuentra disponible en las bases de datos. Utilizando la información disponible del gen de la β-globina humana, ¿qué dos estrategias puede usar para aislar el gen de la biblioteca de okapi?
16. Cuando se hace cDNA, el DNA de cadena sencilla producido por la retrotranscriptasa puede convertirse en DNA de doble cadena mediante la DNA polimerasa I. Sin embargo, no se precisa ningún cebador para la DNA polimerasa. ¿Por qué?
17. ¿Qué hechos debe considerar al decidir qué vector utilizar para construir una biblioteca genómica de DNA eucariótico?
18. Se le suministra una biblioteca de cDNA de genes humanos preparada en un vector plasmídico bacteriano. También se le da el gen de levadura clonado que codifica EF-1a, una proteína muy conservada entre los eucariotas. Exponga brevemente cómo utilizaría estos recursos para identificar el clon de cDNA humano que codifica EF-1a.
19. Una vez ha recuperado el clon de cDNA humano de EF-1a del Problema 18, lo secuencia y encuentra que tiene una longitud de 1.384 nucleótidos. Usando este clon de cDNA como sonda, aísla el DNA que codifica EF-1a de una biblioteca genómica humana. Secuencia el clon genómico y encuentra que su longitud es de 5.282 pb. ¿Qué justifica la diferencia de longitud observada entre el clon de cDNA y el clon genómico?

20. Ha recuperado un segmento de DNA clonado y determina que el inserto tiene 1300 pb. Para caracterizar este segmento clonado, aísla el inserto y decide construir un mapa de restricción. Utilizando las enzimas I y II, y después de una electroforesis en gel, determina el número y el tamaño de los fragmentos producidos por las enzimas I y II solas y combinadas, que se muestran a continuación. Construya un mapa de restricción con estos datos, mostrando las posiciones relativas de los sitios de corte de las enzimas de restricción, y las distancias entre ellos en pares de bases.

Enzimas	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)
I	350, 950
II	200, 1.100
I y II	150, 200, 950

21. Para generar una biblioteca de cDNA, el cDNA puede clonarse en vectores. Al analizar los clones de cDNA, a menudo es difícil encontrar clones que contengan todo el gen, hasta el extremo 5′ del mRNA. ¿Por qué?

22. Aunque la captura y el comercio de grandes simios está prohibida en 112 países desde 1973, se estima que unos 1000 chimpancés son sacados de África anualmente y pasados de contrabando a Europa, los Estados Unidos, y Japón. Este tráfico ilegal es a menudo encubierto simulando nacimientos en cautividad. Hasta hace poco no se han utilizado pruebas de identidad genética para descubrir estas actividades ilegales debido a la falta de disponibilidad de marcadores altamente polimórficos y por la dificultad de obtener muestras de sangre de chimpancé. Recientemente se ha publicado una investigación en la que se extrajeron muestras de DNA de la raíz de pelos de chimpancé acabados de arrancar, y se utilizaron como molde para PCR. Los cebadores utilizados en estos experimentos flanquean sitios altamente polimórficos del DNA humano, que resultan de un número variable de repeticiones en tándem. Se analizaron varias crías de chimpancé sospechosas y sus supuestos progenitores para determinar si las crías eran «legítimas» o si eran el producto de tráfico ilegal. A continuación se muestran los datos de transferencia de Southern.



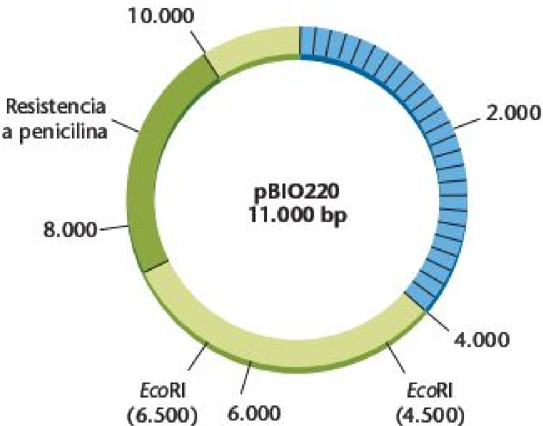
Carril 1: chimpancé padre
Carril 2: chimpancé madre
Carriles 3-5: descendientes putativos A, B y C

Examine estos datos cuidadosamente y elija la mejor conclusión:

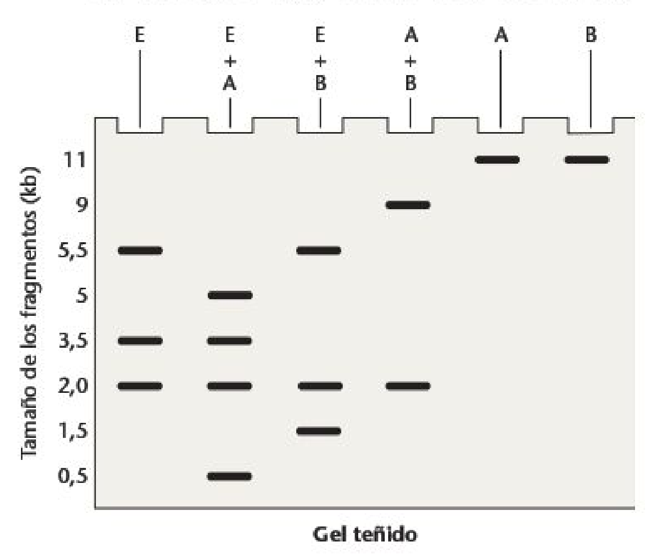
(a) Ninguna de las crías es legítima.
(b) Las crías B y C no son descendientes de estos padres y fueron probablemente compradas en el merdado ilegal. Los datos son congruentes con que la cría A es legítima.
(c) Las crías A y B son de los padres mostrados, pero la C no lo es y probablemente fue comprada en el mercado ilegal.
(d) No hay suficientes datos para extraer conclusiones. Se deberían analizar sitios polimórficos adicionales.
(e) No se pueden extraer conclusiones ya que se utilizaron cebadores «humanos».

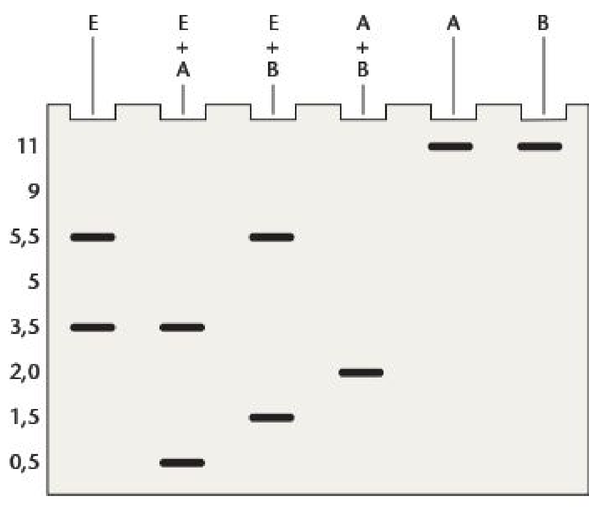
23. El siguiente mapa de restricción parcial muestra un plásmido recombinante, pBIO220, formado por un trozo de DNA clonado de *Drosophila* (zona rayada) que incluye el gen *rosy* en el vector pBR322, que también contiene un gen de resistencia a penicilina, *pen*. La porción de vector del plásmido sólo contiene los dos sitios de restricción de E mostrados, y no contiene ningún sitio de A ni de B. El gel muestra varias digestiones de restricción de pBIO220.





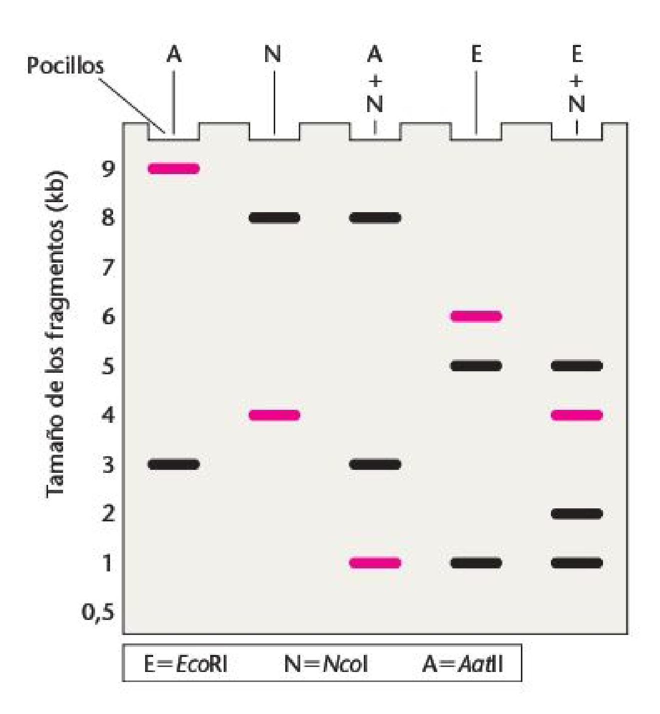
(a) Utilice el patrón de bandas del gel para deducir dónde están localizadas las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción en el fragmento clonado.
(b) Se utilizó una copia de 2.000 pb amplificada por PCR del gen *rosy* completo para rastrear el mismo gel mediante la transferencia de Southern. Utilice los resultados mostrados a continuación para deducir la localización de *rosy* en el fragmento clonado. Vuelva a dibujar el mapa, mostrando la localización de *rosy*.





Transferencia de Southern

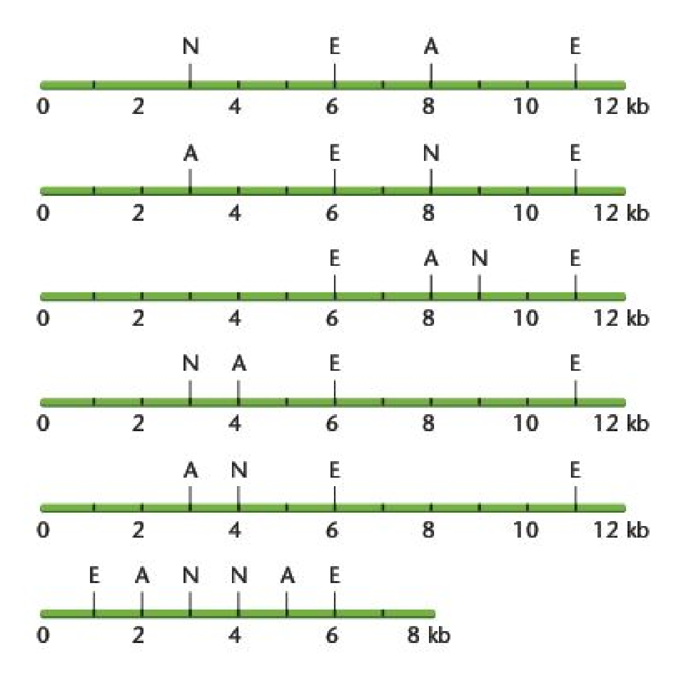
24. Uno de los seis mapas de restricción que se muestran en la siguiente página es congruente con el patrón de bandas que se muestra en la figura del gel después de digerir con varias endonucleasas de restricción. Se muestran las enzimas utilizadas.



(a) Del análisis del patrón de bandas del gel, seleccione el mapa correcto y explique sus razonamientos.

(b) Aplicando la transferencia de Southern a este gel, las bandas mostradas en púrpura hibridan con el gen *pep*. ¿Dónde está localizado el gen *pep*?

25. Enumere los pasos implicados en el rastreo de una biblioteca genómica por traducción reversa (genética reversa). ¿Qué debe saber antes de iniciar este procedimiento? ¿Cuáles son los problemas potenciales de este procedimiento, y cómo pueden superarse o minimizarse?



26. Para estimar el número de sitios de corte en un trozo concreto de DNA de tamaño conocido, puede aplicar la fórmula $N/4^n$, en la que *N* es el número de pares de bases del DNA diana, y *n* es el número de pares de bases en la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción. Si la secuencia de reconocimiento de *Bam*HI es GGATCC y el fago λ contiene aproximadamente 48.500 pb, ¿cuántos sitios de corte esperaría?

27. En una reacción de PCR típica, ¿qué fenómenos se producen en los siguientes intervalos de temperatura? (a) 90-95°C; (b) 50-70°C; y (c) 70-75°C?

28. Un método ampliamente utilizado para calcular la temperatura de hibridación de los cebadores usados en una PCR es 5 grados por debajo de la T_m (°C), que se calcula según la ecuación - 81,5 + 0,41 (*%GC*) − (675/N), en la que %GC es el porcentaje de nucleótidos GC del oligonucleótido, y N es la longitud del mismo. Observe que en esta fórmula tanto el contenido en GC como la longitud del oligonucleótido son variables. Suponiendo que tiene el oligonucleótido que se muestra a continuación como cebador, calcule la temperatura de hibridación para la PCR. ¿Qué relación hay entre la T_m (°C) y el %GC? (*Nota:* En realidad, este cálculo sólo proporciona un punto de partida para la determinación empírica de la mejor temperatura de hibridación.)

5′-TTGAAAATATTTCCCATTGCC-3′

29. Generalmente pensamos que la mayor actividad de las enzimas se produce a 37°C, aunque en la PCR la DNA polimerasa se somete a múltiples exposiciones a temperaturas relativamente altas, y parece que funciona adecuadamente a 70-75°C. ¿Qué tienen de especial las enzimas que polimerizan el DNA usadas de manera típica en la PCR?

30. ¿Cómo se usan los dideoxinucleótidos (ddNTPs) en el método de terminación de la cadena de secuenciación del DNA?

31. Suponga que ha realizado una secuenciación normal de DNA utilizando el método de terminación de la cadena. Realiza todos los pasos correctamente, y separa electroforéticamente los fragmentos de DNA resultantes también correctamente, pero cuando mira el gel de secuencia, muchas de las bandas están duplicadas (en términos de longitud) en otros carriles. ¿Qué puede haber pasado?

LECTURAS SELECCIONADAS

Burger, S.L., and Kimmel, A.R. 1987. *Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods in Enzymology*. Vol. 152. San Diego: Academic Press.

Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., and Helling, R.B. 1973. Construction of biologically functional plasmids *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 70:3240–3244.

Colosimo, A., Goncz, K.K., Holmes, A.R., et al. 2000. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTech*. 29:314–31.

Danna, K., and Nathans, D. 1971. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 68:2913–2917.

Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* (Apr.) 262:56–65.

Old, R.W., and Primrose, S.B. 1994. *Principles of Genetic Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 5th ed. Palo Alto: Blackwell Scientific.

Oste, C. 1988. Polymerase chain reaction. *BioTech*. 6:162–67.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

Sanger, F., and Couslon, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol*. 94:441–448.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503–07.

Genómica y proteómica



Arabidopsis thaliana, uno de los organismos modelo utilizados en estudios genéticos.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La genómica utiliza métodos de secuenciación y análisis para estudiar el genoma completo de los organismos.
- La genómica abarca diversos campos, incluyendo la genómica estructural, la genómica funcional y la genómica comparativa.
- El análisis de los datos de la secuencia del genoma mejora nuestras ideas sobre el tamaño y la organización de los genomas procarióticos.
- El genoma humano contiene de 20.000 a 24.000 genes organizados en grupos y separados por largos trechos de DNA espaciador intergénico.
- La genómica comparativa es útil para estudiar las relaciones evolutivas entre los genes, las familias génicas y los organismos.
- La proteómica se utiliza para proporcionar información sobre el contenido proteico, la estructura y la función de los componentes subcelulares.

El término **genoma** se acuñó en 1920, cuando los genéticos empezaron a cambiar del estudio de genes individuales para centrarse en una imagen superior: el conjunto de genes que llevan los organismos (siendo esta la definición de genoma). Para identificar y cartografiar de manera sistemática todos los genes del genoma de un organismo, los genéticos desarrollaron una aproximación en dos fases: (1) identificar mutaciones espontáneas o generar colecciones de mutantes usando agentes químicos o físicos, y (2) generar mapas genéticos mediante análisis de ligamiento utilizando las cepas mutantes. Aunque originalmente se estudió un amplio repertorio de organismos, el énfasis se fue centrando gradualmente en unos pocos, incluyendo *Drosophila*, maíz, ratón, bacterias y levadura. Estos organismos han sido ampliamente estudiados en genética, y se han convertido en organismos modelo para invertebrados (*Drosophila)*, gramíneas (maíz), mamíferos incluidos los humanos (ratón), procariotas (*E. coli*) y eucariotas inferiores incluidos los hongos (levadura). (Véase el Capítulo 1 para una discusión sobre los organismos modelo.) En algunos organismos como *Drosophila*, los genes se cartografiaron en sitios específicos de los cromosomas, generándose mapas físicos.

Esta aproximación, que se desarrolló hace unos 90 años, ha sido la columna vertebral del análisis genético, y es todavía muy utilizada en genética. En el Capítulo 21 se consideran detalladamente estos métodos de análisis genético, y también los métodos modernos que se usan para diseccionar la función génica. La limitación del análisis mutacional es que se necesita al menos una mutación de cada gen para identificar todos los genes del genoma, y obtener mutaciones es una tarea muy lenta. Además, a menudo el fenotipo de las mutaciones es letal o difícil de visualizar, lo que dificulta o imposibilita cartografiar los genes mutados.

Durante la década de 1980, los genéticos empezaron a utilizar la tecnología del DNA recombinante como una segunda aproximación al análisis genético, cartografiando secuencias de DNA clonadas en cromosomas específicos. La mayor parte de estas secuencias no eran genes, sino marcadores como polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de un único nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) y otros marcadores moleculares. Una vez asignados a un cromosoma, estos marcadores se utilizaban en análisis de árboles genealógicos para establecer un ligamiento entre los marcadores y enfermedades genéticas. Este método, denominado clonación posicional (que se describe con detalle en el Capítulo 22), se utilizó para cartografiar, aislar, clonar y secuenciar los genes de la fibrosis quística, la neurofibromatosis, y de docenas de otras enfermedades. Aunque la clonación posicional identifica un gen cada vez, a mediados de la década de 1980 ya se habían asignado más de 3.500 genes y marcadores a cromosomas humanos concretos, lo que situó a los genéticos en el umbral para producir mapas de alta resolución de todos los cromosomas humanos.

En 1977, cuando se estaban desarrollando los descubrimientos basados en el DNA recombinante para el cartografiado genético, Fred Sanger y sus colaboradores iniciaron el campo de la **genómica** (el estudio de genomas) utilizando un método recién desarrollado de secuenciación del DNA para secuenciar el genoma de 5.400 nucleótidos del virus ϕX174. Poco después se secuenciaron otros virus, pero el proceso era lento y muy costoso, lo que limitaba su uso a genomas pequeños. Durante la siguiente década, el desarrollo de métodos de secuenciación nuevos y automáticos hicieron posible considerar la secuenciación de genomas eucarióticos, más largos y complejos, incluyendo los 3200 millones de nucleótidos que constituyen el genoma humano haploide, que es una 600.000 veces más largo que el de ϕX174.

Actualmente se han secuenciado ya centenares de genomas de procariotas y eucariotas, y hay más de mil proyectos en ejecución, lo que ha hecho que la genómica sea un campo importante con objetivos muy diversos (Tabla 20.1). La genómica incluye diversos campos, como la **genómica estructural**, la **genómica funcional** y la **genómica comparativa**. La genómica estructural incluye la construcción de los datos de la secuencia del genoma, el descubrimiento de los genes y su localización, y la construcción de mapas génicos. La genómica funcional estudia la función biológica de los genes, su regulación y sus productos, y la genómica comparativa compara la secuencia de genes y proteínas de diferentes genomas para elucidar las relaciones funcionales y evolutivas. La genómica comparativa también es importante para desarrollar organismos modelo para las enfermedades humanas.

La **proteómica** es una extensión de la genómica, y su objetivo es el estudio de las proteínas presentes en una célula en un momento dado bajo unas condiciones determinadas[2]. La proteómica incluye (1) la identificación de todas las proteínas expresadas en una célula bajo unas determinadas condiciones, (2) la naturaleza y el alcance de cualquier modificación postraduccional de las proteínas, (3) la naturaleza y el alcance de las interacciones proteína-proteína[3], y (4) la localización subcelular de las proteínas en diversos compartimentos celulares.

La agrupación y el análisis de la información genómica es una tarea a gran escala que requiere mucho trabajo y el esfuerzo coordinado de muchos laboratorios. Por este motivo, a menudo los genéticos establecen colaboraciones denominadas

---

[2] *Nota del traductor:* la proteómica también permite analizar las proteínas no contenidas en estructuras celulares, como por ejemplo el contenido proteico secretado de glándulas y el presente en los fluidos de organismos adultos y embriones, como el suero sanguíneo, el fluido cefalorraquídeo o el fluido cerebroespinal embrionario, entre otros.

[3] *Nota del traductor:* el estudio de la naturaleza y el alcance de las interacciones proteína-proteína también se suele denominar *interactómica.* También se habla de *degradómica* como el estudio de los patrones fisiológicos de degradación proteica, y de *transcripctómica* como el estudio de los genes transcritos (mRNA) en una célula o un tejido determinados en un momento concreto y bajo unas condiciones específicas.

TABLA 20.1 **OBJETIVOS DE LA GENÓMICA**

Compilar las secuencias genómicas de los organismos
Establecer la localización de todos los genes de un genoma
Anotar el conjunto de genes de un genoma
Establecer la función de todos los genes de un genoma
Generar perfiles de expresión génica para las células bajo diferentes condiciones
Identificar todas las proteínas que pueden producirse a partir de un genoma dado
Comparar los genes y las proteínas entre organismos para establecer relaciones evolutivas

proyectos genoma. Uno de los mayores y más conocidos de estos proyectos es el **Proyecto Genoma Humano** (**HGP**).

El Proyecto Genoma Humano es un esfuerzo internacional coordinado para determinar la secuencia de los 3.200 millones de pares de bases del genoma humano haploide, y para identificar todos los genes que contiene. Bajo el paraguas del HGP, se han establecido proyectos genoma para diversos organismos modelo, incluyendo bacterias (*Escherichia coli*), levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), un nematodo (*Caenorhabditis elegans*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y ratón (*Mus musculus*).

En este capítulo se describe la tecnología genómica y se resumen los hallazgos más importantes en genómica estructural de diversos proyectos genoma usando organismos procarióticos y eucaróticos. Este resumen incluye ideas sobre la organización de genomas seleccionados y sobre cómo se organizan los genes en los cromosomas humanos. También se discutirán las aplicaciones de la genómica comparativa, incluyendo los esfuerzos para determinar el número mínimo de genes necesarios para la vida, y el desarrollo de sistemas modelo para las enfermedades humanas. Finalmente, se examinará cómo los métodos y las aplicaciones de la proteómica proporcionan ideas sobre la estructura y la función de los orgánulos.

20.1 Genómica: la secuenciación es la base para identificar y cartografiar todos los genes del genoma

Los genéticos usan dos métodos diferentes para secuenciar genomas. El primero que se desarrolló fue el **método de clon a clon** [Figura 20.1(a)]. Empieza con la construcción de una biblioteca con fragmentos clonados largos que incluyen el DNA de todo el genoma de un organismo. Después, los clones se ensamblan en mapas genéticos y físicos que abarquen todo el genoma. La secuencia nucleotídica se determina clon a clon, hasta que se ha secuenciado todo el genoma. El método de clon a clon fue el elegido para dar publicidad al Proyecto Genoma Humano, financiado por el NIH y el Departamento de Energía de los EEUU. Este método se basa en la construcción de mapas de restricción y de grandes clones genómicos que proporcionan la base para la secuenciación del genoma. En esta aproximación, los pasos limitantes son la generación de clones de gran tamaño y de los mapas de restricción, y los proyectos genoma que usan esta aproximación requieren largos períodos de tiempo para su finalización.

El **método de la perdigonada** (*shotgun* en inglés) [Figura 20.1(b)] fue posible gracias a los avances en la tecnología de secuenciación y al desarrollo de programas para ensamblar secuencias de clones solapados muy cortos en una secuencia continua. En este método, se hacen dos o tres preparaciones de DNA genómico. Una se corta en fragmentos cortos de una 2kb, otra en fragmentos más largos de 15-20 kb, y también se puede hacer una tercera cortada en fragmentos de 200-300 kb. Se construye una biblioteca genómica con cada preparación. Se seleccionas y secuencian clones al azar de estas bibliotecas. Entonces se utiliza un programa para ensamblar largos tramos de secuencia a partir de los fragmentos cortos solapados de estas bibliotecas, usando las secuencias de los clones más largos como marco de referencia.

Este método, desarrollado por Craig Venter y sus colaboradores del Instituto de Investigación Genómica (TIGR, *The Institute for Genomic Research*), fue el utilizado para secuenciar el genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae* en 1995, siendo ésta la primera secuencia genómica completa de un ser vivo. Tras refinar este método y utilizarlo para secuenciar los genomas de otros procariotas, se utilizó para secuenciar genomas eucarióticos, incluyendo el de *Drosophila*, el de perro y el de los humanos. En la última sección de este capítulo, se discutirá el Proyecto Genoma Humano con más detalle, y se resumirán algunas de las propiedades del genoma humano descubiertas con estos métodos de secuenciación.

20.2 Generalidades del análisis genómico

Los proyectos genoma generan grandes cantidades de información sobre la secuencia del DNA. Estos datos son útiles sólo cuando se han analizado e interpretado. Para identificar y caracterizar las regiones codificantes de los genes de las secuencias anónimas de DNA, se necesitan diversos tipos de análisis mediante la utilización de programas y bases de datos. Algunos de los objetivos de estos análisis incluyen:

1. Asegurar que la secuencia está completa y es precisa.
2. Identificar los genes encontrando las pautas de lectura abiertas (ORF, del inglés *open reading frames*).
3. Encontrar los sitios promotores, de inició de la transcripción y de inicio de la traducción para confirmar la identidad del gen.
4. En los genomas eucarióticos, encontrar los sitios de corte y empalme, los intrones y los exones.
5. Traducir la secuencia de DNA en una secuencia proteica, buscando en las seis fases de lectura.
6. Comparar la secuencia del DNA con la de otras proteínas conocidas para verificar que se ha localizado un gen.



FIGURA 20.1 (a) En el método de clon a clon, los clones de una biblioteca genómica se organizan en mapas genéticos y físicos de cada cromosoma. Tres ordenar los clones en mapas físicos, se rompen en clones solapados más pequeños que cubren cada cromosoma. Se secuencia cada clon pequeño, y la secuencia genómica se ensambla uniendo la secuencia nucleotídica de los clones. (b) En el método de la perdigonada, se construye una biblioteca genómica a partir de fragmentos de DNA genómico. Los clones de la biblioteca se seleccionan aleatoriamente y se secuencian. La secuencia se ensambla mediante los solapamientos entre clones de distintas bibliotecas. Esto lo realiza un ordenador, que usa un programa de ensamblaje diseñado para el análisis genómico.

Las secuencias proteicas predichas se analizan para predecir su función. A menudo esta función se puede inferir a partir de la secuencia de una o más proteínas homólogas presentes en bases de datos cuya función sea ya conocida. El objetivo final del análisis de la secuencia es obtener una descripción funcional completa de todos los genes del genoma de un organismo.

La compilación de la secuencia

Para asegurar que la secuencia nucleotídica de un genoma está completa y no contiene errores, el genoma se secuencia más de una vez. Este proceso se denomina **compilación**. Por ejemplo, usando el método de la perdigonada en el genoma de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, los investigadores secuenciaron siete veces los 6,3 millones de nucleótidos, para asegurarse de que la secuencia era precisa. Incluso con este nivel de redundancia, el programa de ensamblaje reconoció 1.604 regiones que precisaban más aclaraciones. Para mejorar la precisión, estas regiones se analizaron y secuenciaron de nuevo. Finalmente, la secuencia por el método de la perdigonada se comparó con la secuencia de dos regiones genómicas muy separadas obtenidas por clonación convencional. La secuencia de 81.843 nucleótidos clonada y secuenciada encajaba perfectamente con la obtenida con el método de la perdigonada. Este nivel de cuidado no es inusual; en todos los proyectos genoma se toman precauciones parecidas.

El HGP secuenció 12 veces la porción eucromática del genoma humano. El proyecto de secuenciación privado con base en Celera, una compañía de biotecnología, que utilizó el método de la perdigonada, examinó esta parte del genoma más de 35 veces. En 2001 se completó el borrador del genoma, todavía con algunas tareas sin concluir. Los años 2003 y 2004 se publicaron actualizaciones de la secuencia. Tal vez en el futuro, los investigadores empezarán a secuenciar el 15 por ciento del genoma que contiene heterocromatina. El año 2003 se publicó la versión final de la porción eucromática del genoma. Originalmente se excluyó de este diseño a las regiones heterocromáticas, ya que contienen largos tramos de secuencias de DNA repetitivo que al principio se creía que no contenían genes. Sin embargo, al secuenciar el genoma de *Drosophil*a, los investigadores descubrieron que las regiones heterocromáticas contienen algunos genes (unos 50 en este organismo). En consecuencia, las regiones heterocromáticas del genoma humano deben secuenciarse para estar seguros de que se han identificado todos los genes. Una vez se ha secuenciado el genoma humano o cualquier otro, se ha compilado y se ha realizado la corrección de pruebas, empieza el siguiente estadio, la anotación.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se puede verificar la exactitud del genoma, y que éste está completo? ¿Hay alguna manera de detectar la ausencia de secuencias?

La anotación de la secuencia

Una vez se ha secuenciado, compilado y comprobado la exactitud de un genoma, la siguiente tarea es encontrar todos los genes que codifican productos (proteínas y RNA). Este es el primer paso de la **anotación**, el proceso que identifica los genes, sus secuencias reguladoras y su función o funciones. La anotación también identifica los genes que no codifican proteínas (incluido el RNA ribosómico, el RNA transferente y los RNA nucleares pequeños), y encuentra y caracteriza los elementos genéticos móviles y las familias de secuencias repetitivas que puedan estar presentes en el genoma.

La localización de los genes que codifican proteínas se realiza analizando la secuencia con programas específicos. Las secuencias que codifican genes tienen diversas características de identidad. Los genes que codifican proteínas están formados por una **pauta de lectura abierta** (**ORF**, del inglés *open reading frame*), tripletes nucleotídicos que se pueden traducir en la secuencia aminoacídica de una proteína. Los ORF empiezan con una secuencia de iniciación (generalmente ATG) y terminan con una secuencia de terminación (TAA, TAG o TGA).

Puesto que la información genética está codificada en grupos de tres nucleótidos, los datos de la secuencia original no clarifican por dónde se debe empezar el análisis de la secuencia, si por el primer nucleótido, por el segundo o por el tercero. Por lo tanto este análisis empieza con el primer nucleótido y examina la secuencia mirando los nucleótidos de tres en tres, buscando ORFs. Los siguientes ciclo de análisis empiezan con el segundo y el tercer nucleótido de la secuencia respectivamente, buscando ORFs de la misma manera. Así, en la secuencia de DNA hay tres posibles pautas de lectura.

Sin embargo, el análisis de las tres pautas de lectura en la secuencia de DNA no significa el fin del trabajo. Estos datos solo proporcionan la secuencia nucleotídica de una de las cadenas de DNA. Puede ser que esta cadena *no* sea la que codifica el gen; esta información podría estar en la cadena complementaria. Esto significa que, para determinar si alguna cadena contiene un gen que codifique una proteína, la búsqueda de ORFs debe examinar la cadena secuenciada *y* su complementaria. Para este análisis, la cadena secuenciada se convierte en su complementaria (generalmente utilizando un programa). Como se hizo con la cadena secuenciada, la búsqueda de ORFs en la cadena complementaria analiza las tres posibles pautas de lectura. Esto significa que para buscar los ORFs de una secuencia de DNA sin identificar deben examinarse seis posibles pautas de lectura. La Figura 20.2 muestra los resultados de una búsqueda mediante ordenador de los ORF y de todas las pautas de lectura de la secuencia nucleotídica del gen *lacY* de *E. coli*. Obsérvese que cada pauta de lectura identifica ORFs, pero sólo uno de ellos cubre toda la secuencia. Generalmente los ORFs incorrectos especifican secuencias peptídicas muy cortas.

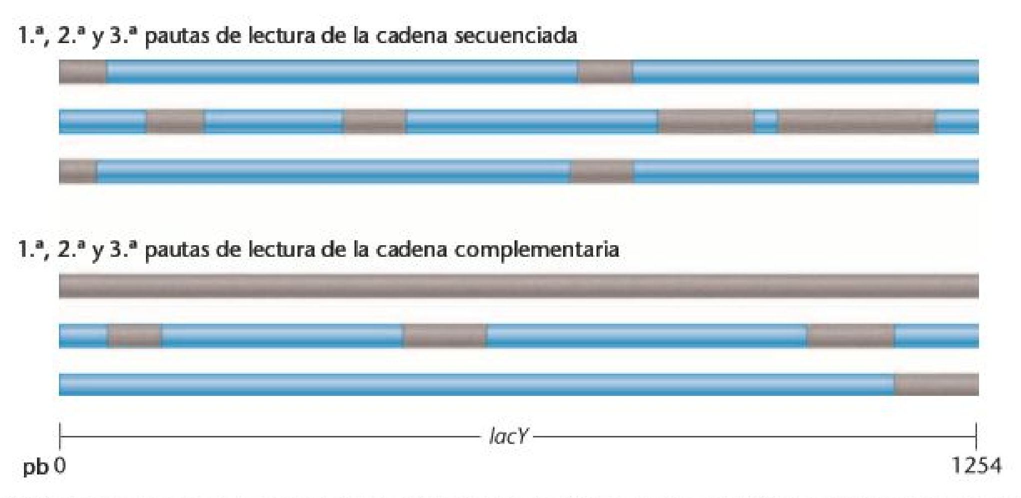


FIGURA 20.2 Análisis de ORFs de la secuencia nucleotídica del gen *lacY* de *E.coli*. Los ORFs de cada una de las seis pautas de lectura posibles, tres para cada cadena de DNA, se muestran como regiones oscuras. Sólo se marcan los ORFs de más de 50 codones. Puesto que la mayoría de genes tienen muchos más de 50 codones, la longitud del ORF es una indicación de que es un gen real. En este caso, sólo un ORF cubre la secuencia completa y muestra la localización y la orientación del gen *lacY*.

Si antes de empezar el análisis ya se han identificado secuencias con ORF, se puede reducir el número de pautas de lectura a examinar. Una de las estrategias para encontrar genes es buscar ORFs que empiecen con ATG, y que a cierta distancia tengan una secuencia de terminación.

Ahora resuelva esto

El Problema 20.7 de la página 597 implica la búsqueda de secuencias genómicas correspondientes a ORFs.

Sugerencia: Al establecer los límites del tamaño de los ORFs que pueden representar genes, tenga en cuenta la longitud media de los genes en el genoma del organismo.

La organización de los genes en los genomas eucarióticos (incluyendo el genoma humano) dificulta la búsqueda directa de ORFs. Primero, muchos genes eucarióticos tienen intrones, regiones no codificantes que interrumpen a las codificantes (los exones). En consecuencia, muchos si no todos los genes eucarióticos no están organizados como ORFs continuos, sino que su secuencia consiste en ORFs intercalados con secuencias que representan intrones. Las primeras versiones de los programas buscadores de ORFs interpretaban a menudo los exones como genes separados, porque los codones de terminación son comunes en los intrones. Segundo, a menudo los genes humanos y de otros eucariotas están muy separados entre sí, lo que incrementa la posibilidad de encontrar falsos ORFs en las regiones que hay entre los grupos génicos.

La Figura 20.3(a) muestra una porción de la secuencia del genoma humano. Una inspección informal no muestra con claridad si esta secuencia contiene un gen o más de uno, ni dónde empiezan y terminan. Al analizar esta secuencia, las marcas identificables de los genes proporcionan información de lo que ésta contiene. Las regiones de control al inicio de los genes están marcadas por la secuencia TATA. Los sitios de procesamiento entre los exones y los intrones presentan una secuencia predecible (la mayoría empiezan con GT y terminan con AG), como también la presenta el final del gen, dónde se añade la cola de poli-A al trascrito. Además, si la secuencia del DNA codifica una proteína, contiene una pauta de lectura abierta. Los conocimientos procedentes de la secuenciación de cDNA y de los genes anotados de otras especies también proporcionan pistas que se pueden usar para descifrar una secuencia.

Para rastrear las secuencias se usan programas de computador que buscan éstas y otras características de los genes. El análisis de la secuencia de la Figura 20.3(b) muestra que contiene una región de control y tres exones. Las dos regiones no sombreadas entre los exones representan intrones, las regiones que son eliminadas durante el procesamiento del mRNA. La utilización de estas secuencias para buscar en bases de datos de secuencias genómicas muestra que ésta es la secuencia del gen de la β-globina humana.

Las versiones más recientes de los programas de rastreo de ORFs están diseñadas para analizar genomas eucarióticos con gran eficiencia. Estos programas buscan las características mencionadas anteriormente, y otras características de los genes como el sesgo en la utilización de codones y, en algunos genomas, la presencia de islas de CpG.

El sesgo en la utilización de codones es la utilización selectiva de uno o de dos codones para codificar aminoácidos que pueden venir especificados por un número superior de codones. Por ejemplo, la alanina puede venir codificada por GCA, GCT, GCC y GCG. Si los codones se usasen aleatoriamente, cada uno de ellos sería usado aproximadamente el 25 por ciento de las veces. Sin embargo, en el genoma humano, GCC se usa el 41

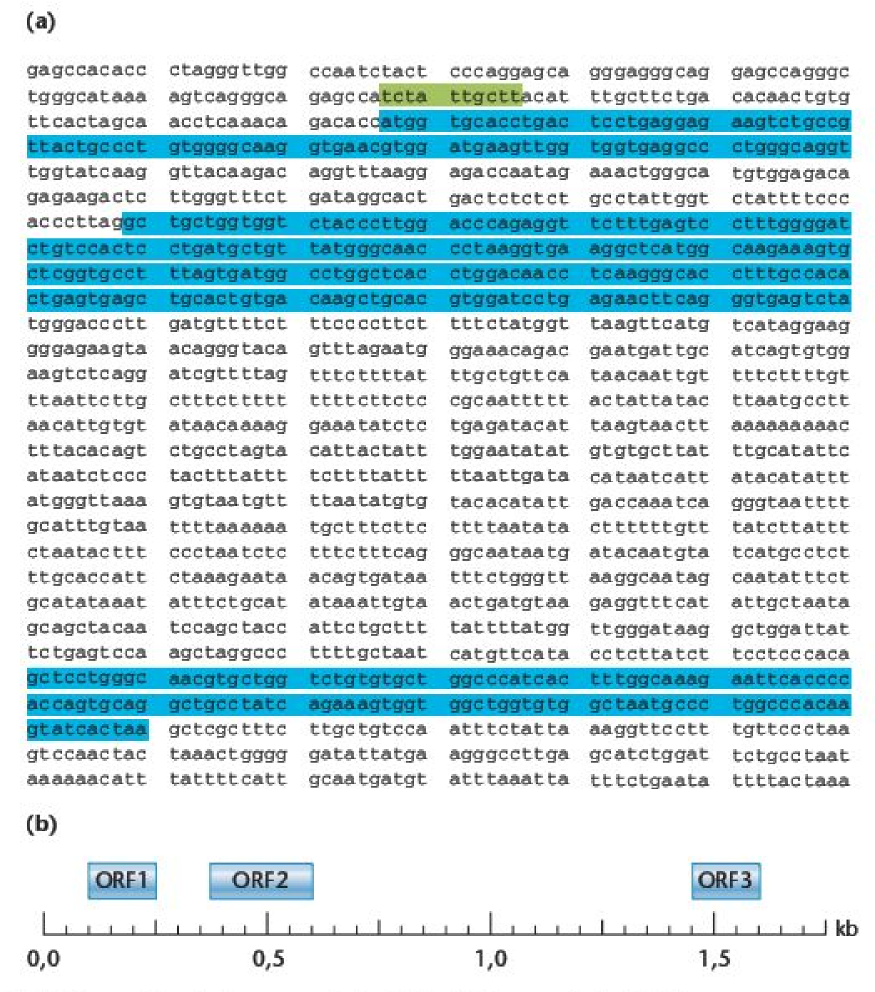


FIGURA 20.3 Análisis de la información de la secuencia de DNA. (a) Secuencia de DNA humano que muestra la localización de la caja TATA corriente arriba (en verde) y de las pautas de lectura abiertas (ORFs) de los tres exones (en azul) del gen de la β-globina humana. (b) Esquema que muestra el tamaño y la localización de las pautas de lectura abiertas de los tres exones del gen de la β-globina humana codificado por la secuencia de (a).

por ciento de las veces, y GCG solo el 11 por ciento de las veces. El sesgo en la utilización de codones está presente en los exones pero no debería estarlo en los intrones ni en las regiones intergénicas. Las **islas de CpG** son regiones de DNA que contienen muchas copias de este doblete de nucleótidos. Se encuentran en regiones ricas en genes en el genoma de los mamíferos, a menudo adyacentes a los genes. Sin embargo, la búsqueda del sesgo en la utilización de codones y de otras características de los genes eucarióticos como las islas de GpC no es una prueba infalible, y el rastreo manual es una técnica de apoyo común.

20.3 La genómica funcional clasifica los genes e identifica sus funciones

Después de anotar una secuencia genómica, la siguiente tarea es asignar funciones a todos los genes de la secuencia. Algunos de los genes pueden tener funciones previamente asignadas mediante los métodos clásicos de mutagénesis y de cartografía de ligamiento (que se describen en el Capítulo 21), pero otros muchos genes no tienen una función bien definida asignada. Una aproximación para asignar funciones a estos genes es la utilización de búsquedas de homología. Este análisis tiene diversos componentes:

1. Buscar en bases de datos como GenBank para encontrar genes parecidos aislados en otros organismos.
2. Comparar la secuencia de un ORF con la de un gen bien caracterizado de otro organismo.
3. Rastrear el ORF en busca de motivos funcionales, regiones del DNA que codifican dominios proteicos como canales de iones, regiones de unión a DNA o señales de secreción/exportación, entre otros.

Vamos a examinar cómo se usa esta estrategia en el análisis de un genoma procariótico.

Genómica funcional de un genoma bacteriano

La Tabla 20.2 muestra el resultado de un análisis de ORFs del genoma de *P. aeruginosa*. En este análisis, como en todos los análisis de genómica funcional, los ORFs se clasifican en una escala según el nivel de confidencia. Los genes de nivel 1 son aquellos cuya función ya es conocida a partir de análisis genéticos convencionales, o son genes cuya función ya ha sido demostrada de otra manera. Los genes de nivel 2 presentan una gran homología con genes cuya función es conocida en otros organismos. Los genes de nivel 3 tienen una función propuesta a partir de los motivos que codifican o por presentar una homología limitada con genes de otros organismos. Los genes de nivel 4 no tienen ninguna función conocida ni propuesta. En el análisis funcional del genoma de *P. aeruginosa* (Tabla 20.3), aproximadamente la mitad de los genes no presenta ninguna función conocida ni propuesta. Esta situación no es exclusiva de *P. aeruginosa*; en casi todos los organismos cuyo genoma se ha secuenciado hasta la fecha, aproximadamente la mitad de los genes no tiene ninguna función conocida.

El objetivo del análisis del genoma de *P. aeruginosa*, como en todos los análisis genómicos, es poder incluir todos los genes en los niveles 1 y 2, y entender cómo estos genes y sus productos interaccionan en la biología del organismo. Los niveles usados en genómica funcional no reflejan la importancia de un gen en la supervivencia o la reproducción del organismo, sino que son asignaciones basadas en el conocimiento de la función del gen.

Estrategias para la asignación funcional de genes desconocidos

Levadura (*S. cerevisiae*) es uno de los organismos eucarióticos modelo para análisis genético. A pesar de décadas de estudio utilizando el análisis genético clásico, sólo aproximadamente un tercio de sus 6.200 genes revelados mediante la secuenciación de su genoma se ha caracterizado completamente (genes asignados al nivel 1). En los años posteriores a la publicación del genoma de levadura, el número de genes caracterizados ha aumentado hasta 3.700, y se han asignado unos 500 genes más a los niveles 2 y 3 en base a su homología. Esto deja unos 1.900-2.000 genes que codifican proteínas de función desconocida.

Puesto que hay una colección de técnicas genéticas, bioquímicas y moleculares bien establecidas para estudiar levadura, es instructivo ver cómo se aplican en los análisis funcionales del genoma de levadura. La utilización de estas técnicas ha cambiado; actualmente se integran y se aplican para realizar análisis funcionales a escala genómica, en vez de estudiar un solo gen o una sola proteína cada vez. En el Capítulo 21 se explorarán algunos métodos actuales que los genéticos emplean para analizar la función génica en organismos modelo. Actualmente la genómica funcional usa una gran colección de aproximaciones experimentales, desde los rastreos de mutagénesis clásica hasta la genética reversa, un método que empieza con la secuencia genómica o con una proteína purificada y que progresa hacia el análisis funcional.

¿Cómo lo sabemos?

¿Cómo se determina la función de las proteínas codificadas en un genoma? ¿Qué pasa si el gen que codifica la proteína es único en su género y no se ha visto nunca en ningún otro organismo?

Tabla 20.2 Análisis del genoma de *Pseudomonas aeruginosa*

Características generales			
Tamaño del genoma (bp)	6.264.403		
Contenido G + C	66,6%		
Regiones codificantes	89,4%		

Secuencias codificantes Nivel de confidencia	ORFs	(%)	Definición
1	372	6,7	Genes de *P. aeruginosa* con función demostrada
2	1059	19,0	Fuerte homología con genes con una función demostrada en otros organismos
3	1590	28,5	Genes con una función propuesta a partir de búsquedas de motivos o a homología limitada
4a	769	13,8	Homólogos de genes descritos de función desconocida
4b	1780	32,0	Sin homología con ninguna secuencia descrita
Total	5570	100	

Fuente: Stover, *et al.* 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–64. Tabla 1, p. 961.

TABLE 20.3 **CLASES FUNCIONALES DE GENES PREDICHOS EN *PSEUDOMONAS***

Clase funcional	ORFs Número	%
Adaptación, protección (p.e. proteínas de choque al frío)	60	1,1
Biosíntesis y metabolismo de aminoácido	150	2,7
Resistencia y susceptibilidad a antibióticos	19	0,3
Biosíntesis de cofactores, de grupos prostético y de transportadoress	119	2,1
Catabolismo de compuestos carbonosos	130	2,3
División celular	26	0,5
Pared celular	83	1,5
Metabolismo intermediario central	64	1,1
Chaperoninas (tutores moleculares) y proteínas de choque térmico	52	0,9
Quimiotaxis	43	0,8
Replicación, recombinación, modificación y reparación del DNA	81	1,5
Metabolismo energético	166	3,0
Metabolismo de ácidos grafos y de fosfolípidos	56	1,0
Proteínas de membrana	7	0,1
Movilidad y unión	65	1,2
Biosíntesis y metabolismo de nucleótidos	60	1,1
Aparato de secreción/exportación de proteínas	83	1,5
Enzimas putativas	409	7,3
Relacionados a fagos, transposones o plásmidos	38	0,7
Factores secretados (toxinas, enzimas, aglutinantes)	58	1,0
Reguladores transcripcionales	403	7,2
Transcripción, procesamiento del RNA y degradación	45	0,8
Traducción, modificaciones postraduccionales y degradación	149	2,7
Transporte de pequeñas moléculas	555	10,0
Sistemas de regulación de dos componentes	118	2,1
Hipotéticas	1.774	31,8
Desconocidas (hipotéticas conservadas)	757	13,6
Total	5.570	100

Fuente: Stover, *et al.* 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–64.

20.4 Los genomas procarióticos tienen algunas características inesperadas

Se ha completado la secuenciación de más de cien genomas procarióticos y eucarióticos. Los resultados indican que hay diferencias importantes respecto a la organización del genoma entre estos dos grupos de organismos. Por lo tanto, consideraremos la organización de estos dos tipos de genomas por separado. Puesto que la mayor parte de los procariotas tienen genomas pequeños sensibles a la clonación y secuenciación por el método de la perdigonada, la mayoría de los proyectos genoma completados se han centrado en dos tipos de procariotas, las Eubacterias y las Arqueas (Tabla 20.4), y hay más de 200 proyectos más en marcha. Muchos de los genomas procarióticos que ya se han secuenciado pertenecen a organismos que causan enfermedades en humanos, como el cólera, la tuberculosis y la lepra.

La gama de tamaños de los genomas de las Eubacterias

Basándose en los resultados de los proyectos genoma, se pueden hacer una serie de generalizaciones respecto al tamaño y la organización de los genomas de las Eubacterias. Tradicionalmente, se ha pensado que el genoma de las bacterias era relativamente pequeño (de menos de 5 Mb), y que estaba contenido en una sola molécula de DNA circular. La avalancha de



Tabla 20.4 Tamaño del genoma y número de genes en procariotas seleccionados

	Tamaño del genoma (Mb)	Número de genes
Archaea		
Archaeoglobus fulgidis	2,17	2.493
Methanococcus jammaschii	1,66	1.738
Thermoplasma acidophilium	1,56	1.509
Eubacteria		
E. coli	4,64	4.397
Bacillus subtilis	4,21	4.212
H. influenzae	1,83	1.791
Aquifex aeolicus	1,55	1.552
Rickettsia prowazekii	1,11	834
Mycoplasma pneumoniae	0,82	710
Mycoplasma genitalium	0,58	503

información genómica actualmente disponible ha cuestionado todos los aspectos de este punto de vista. Aunque la mayoría de los genomas procarióticos son pequeños, el tamaño de los genomas varía dentro de una gama sorprendentemente amplia. De hecho, hay cierto solapamiento en el tamaño de los genomas bacterianos más grandes (30 Mb en *Bacillus megaterium*) y de los eucariotas más pequeños (12,1 Mb en levadura).

Cromosomas lineales y cromosomas múltiples en bacterias

Si bien la mayor parte de los genomas procarióticos secuenciados hasta la fecha *son* moléculas de DNA circular, cada vez se están identificando más genomas formados por moléculas de DNA lineal, incluyendo el genoma de *Borrelia burgdorferi*, el organismo que causa la enfermedad de Lyme. Quizás lo más importante es que los datos genómicos están desdibujando la distinción entre plásmidos y cromosomas bacterianos, y están redefiniendo la visión que se tiene de los genomas bacterianos como formados por una sola molécula de DNA (Tabla 20.5).

Los plásmidos son moléculas de DNA pequeñas y generalmente circulares que contienen genes que no son esenciales para las células bacterianas que los hospedan. Los plásmidos se replican usando las mismas enzimas que se utilizan para copiar el cromosoma de la célula huésped, y durante la división celular se distribuyen entre las células hija junto con los cromosomas. Puesto que los plásmidos transportan genes no esenciales y pueden transferirse de una célula a otra, y puesto que a menudo un mismo plásmido está presente en bacterias de distintas especies, los genes plasmídicos no están incluidos como parte del genoma bacteriano. Sin embargo, *B. burgdorferi* contiene aproximadamente 17 plásmidos, que contienen al menos 430 genes. Algunos de estos genes son esenciales para la bacteria, incluyendo genes para la biosíntesis de purinas y de proteínas de membrana, que en la mayoría de especies están contenidos en el cromosoma bacteriano.

Recientemente, la secuenciación del genoma de *Vibrio cholerae*, el organismo responsable del cólera, ha revelado la presencia de dos cromosomas circulares (Figura 20.4). El cromosoma 1 (2,96 Mb) contiene 2770 ORFs, y el cromosoma 2 (1,07 Mb) contiene 1115 ORFs, algunos de los cuales codifican genes esenciales, como proteínas ribosómicas. En base en la secuencia nucleotídica, aparentemente el cromosoma 2 procede de un plásmido capturado por una especie ancestral, o podría representar un plásmido con muchos genes cromosómicos insertados.

Otras especies de *Vibrio* también presentan dos cromosomas. La existencia de genomas procarióticos que contienen múltiples cromosomas plantea una pregunta importante. ¿Cuál es la diferencia entre un cromosoma y un gran plásmido? La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que los cromosomas bacterianos tienen algunas propiedades definitorias. La primera es el contenido genético: los genes esenciales para la supervivencia (p.e. los genes para la replicación y la transcripción del DNA, los genes del metabolismo, etc.) se en-

Tabla 20.5 Organización del genoma bacteriano

Especies bacterianas	Número y organización de los cromosomas	Número de plásmidos
Agrobacterium tumefaciens	uno lineal + uno circular	dos circulares
Bacillus subtilis	uno circular	
Bacillus thuringiensis	uno circular	seis
Borrella burgdorferi	uno lineal	>17 circulares y lineales
Buchnera sp.	uno circular	dos circulares
Deinococcus radiodurans	dos circulares	dos circulares
Escherichia coli	uno circular	
Vibrio cholerae	dos circular	

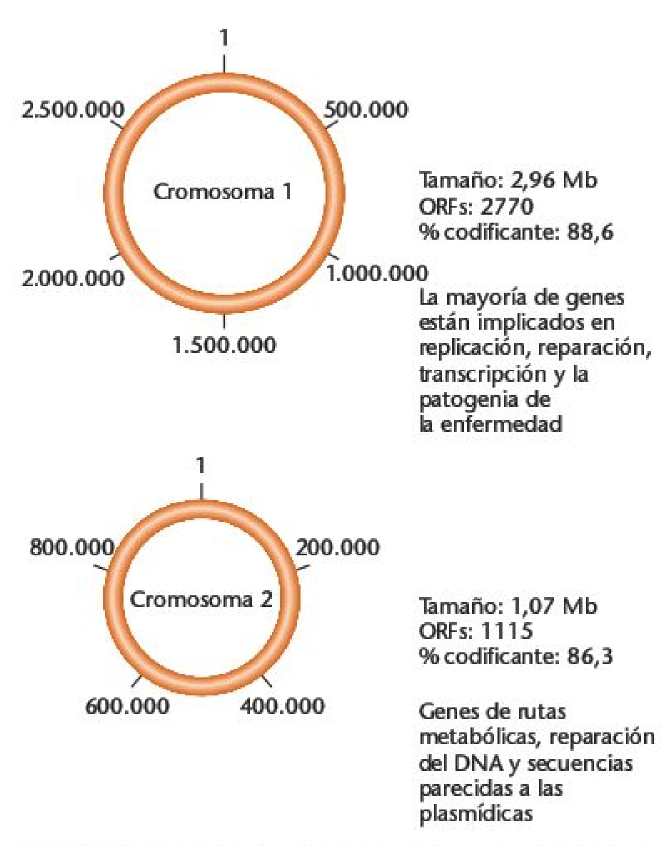


FIGURA 20.4 El genoma de *Vibrio cholerae* está contenido en dos cromosomas. El cromosoma más grande (cromosoma 1) contiene la mayor parte de genes implicados en las funciones celulares esenciales y en la capacidad infectiva. Se desconoce la función de la mayoría de los genes del cromosoma 2 (el 52 por ciento de las 1.115). El sesgo en el contenido genético y la presencia de secuencias parecidas a las plasmídicas en el cromosoma 2 sugieren que este cromosoma era un megaplásmido capturado por un Vibrio ancestral.

cuentran en los cromosomas. La segunda es el tamaño: los cromosomas deberían constituir una porción importante del genoma. La tercera es que los cromosomas deberían encontrarse en todas las cepas de la especie mientras que los plásmidos no. En *Vibrio cholerae*, el cromosoma 2 contiene genes esenciales, representa el 40 por ciento del genoma, y todas las cepas examinadas hasta la fecha lo contienen. En base a estos criterios, es un cromosoma, a pesar de que contiene secuencias procedentes de plásmidos. Todavía falta investigar el origen de este cromosoma y la relación evolutiva con los plásmidos, lo que podría arrojar cierta luz sobre su capacidad de causar el cólera.

Otras bacterias también tienen genomas con dos cromosomas, como *Agrobacterium tumefaciens, Rhodobacter sphaeroides* y *Rhizobacterium meliloti* (Tabla 20.5). El hallazgo de que algunas especies bacterianas tienen dos cromosomas también plantea la pregunta de qué mecanismos reguladores controlan la expresión génica y el metabolismo en un genoma procariótico multicromosómico. Las respuestas a estas y a otras preguntas planteadas por los descubrimientos genómicos redefinirán algunas ideas sobre los genomas procarióticos y sobre la naturaleza de los plásmidos, y pueden proporcionar claves sobre la evolución de los genomas eucarióticos multicromosómicos.

20.5 Los genomas de las eubacterias

Se pueden hacer dos generalizaciones sobre la organización de los genes que codifican proteínas en los cromosomas de las eubacterias. En primer lugar, la densidad génica es muy elevada, de un gen por quilobase de DNA de promedio. Por ejemplo, el genoma de *E. coli* tiene 4,6 Mb, y contiene 4.288 genes que codifican proteínas, lo que representa una densidad muy cercana a la de un gen por kilobase. *Mycoplasma genitalium* tiene un genoma más pequeño (0,58 Mb), con 503 genes, y su densidad génica también se aproxima a la de un gen por kilobase. Este empaquetamiento de los genes en los genomas procarióticos tiene por consecuencia que una proporción muy elevada del DNA (aproximadamente el 85-90 por ciento) sea codificante. En *M. genitalium*, sólo hay unos 110-125 pb de DNA entre sus genes. Típicamente, sólo una pequeña cantidad del genoma bacteriano es DNA no codificante, generalmente en forma de elementos transponibles que se pueden mover de un sitio a otro del genoma. Los intrones son muy poco frecuentes en los genomas bacterianos.

La segunda generalización que se puede hacer es que los genomas bacterianos se caracterizan por la presencia de operones. En la Figura 20.5 se muestra la organización de un pequeño segmento del genoma de *E. coli*. Las líneas que hay debajo de los genes muestran cómo éstos se organizan en unidades de transcripción, con promotores que localizan el inicio de la transcripción y la dirección de cada unidad. En *E. coli*, el 27 por ciento de las unidades de transcripción predichas están contenidas en operones (casi 600 operones). En otros genomas bacterianos, la organización de los genes en

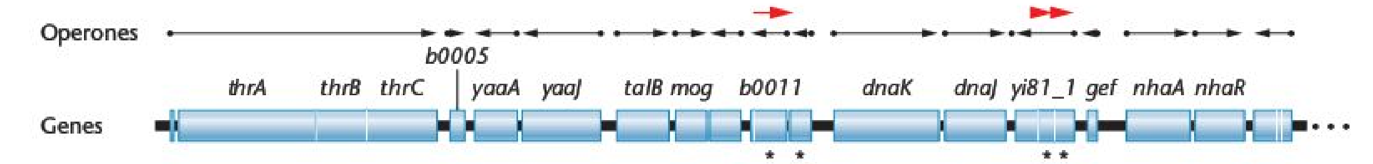


FIGURA 20.5 Porción del cromosoma de *E. coli* que muestra los genes y los operones. Un punto indica el promotor de cada gen u operón. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los genes solapados se identifican con asteriscos.

Operón

Genes

gatC *recA* *pilU* *cmk* *pgsA1* *recJ*

FIGURA 20.6 Un operón del genoma de *A. aeolicus* contiene genes para la síntesis proteica (*gatC*), la recombinación del DNA (*recA* y *recJ*), una proteína de movilidad (*pilU*), la biosíntesis de nucleótidos (*cmk*) y la biosíntesis de lípidos (*pgsA1*). Esta organización desafía la idea convencional de que los genes de un operón codifican productos que controlan una ruta bioquímica común.

unidades de transcripción cuestiona las ideas que se tienen sobre la naturaleza de los operones. En *Aquifex aeolicus*, la mayoría de los genes forman parte de unidades de transcripción policistrónicas que normalmente denominaríamos operones. Sin embargo, en estos organismos no se cumple la definición que dice que los operones contienen genes cuyos productos forman parte de una misma ruta bioquímica. En *A. aerolicus* (Figura 20.6), hay un operón contiene seis genes: dos para la recombinación del DNA, uno para la síntesis de lípidos, uno para la síntesis de ácidos nucleicos, uno para la síntesis proteica y uno que codifica una proteína de motilidad celular. Esta especie también tiene otros operones que contienen genes con diversas funciones diferentes. Este hallazgo, combinado con resultados parecidos de otros proyectos genoma, suscita preguntas sobre la naturaleza de los operones y sobre sus funciones en los procesos bioquímicos de las células bacterianas, y puede hacernos redefinir el concepto de operón.

Obsérvese que en *E. coli* hay varios casos de genes solapados (Figura 20.5), en los que un gen se encuentra contenido dentro de otro en la misma cadena de DNA (mostrados con asteriscos). Los genes solapados son comunes en virus (donde el espacio es lo que prima), pero no son frecuentes en bacterias ni en la mayor parte de los otros organismos.

Los genomas de las Arqueas

Las Arqueas (anteriormente conocidas como Arqueobacterias) son uno de los tres dominios principales de seres vivos. Los otros dos son las Eubacterias (las bacterias verdaderas, sin una membrana que encierre el núcleo, como *E. coli* y *Bacillus*) y los Eucaria (los eucariotas, organismos con una membrana que rodea el núcleo). Las aqueas, como las eubacterias, son procariotas; es decir, no tienen núcleo. Hace poco que se han reconocido como un dominio distinto dentro de los seres vivos.

Típicamente, las arqueas son extremófilas; viven en ambientes extremos con temperaturas muy altas, un alto contenido en sal, altas presiones o pH extremos. Al haberse completado varios proyectos genoma de arqueas, podemos examinar su relación con los organismos de los otros dominios. La arquea *Methanococcus jannaschii* (Figura 20.7) se aisló originalmente de respiraderos submarinos de alta temperatura, a 2.600 metros bajo el nivel del mar, donde vive a una presión de 270 atmósferas y a una temperatura cercana a los 300ºC. Tiene un genoma de DNA circular de doble cadena de 1,66 Mb con 1.738 genes que codifican proteínas organizados en tres cromosomas: un cromosoma circular grande de 166 Mb y dos pequeños cromosomas circulares de 58,4 y 16,5 kb. Muchos de los genes de este organismo (el 58 por ciento) no coinciden con ningún otro gen conocido, pero la mayor parte de los genes implicados en la producción de energía, la división celular y el metabolismo general se parecen mucho a los de las eubacterias. La organización génica también se parece a la de las eubacterias: los genes están densamente empaquetados, tienen operones y no tienen intrones.

Por otro lado, los genes de las arqueas también presentan semejanzas importantes con los genes eucarióticos. Los genes implicados en la síntesis de RNA, de proteínas y de DNA se parecen mucho a los de los eucariotas. Lo más sorprendente es la presencia de proteínas histónicas en los cromosomas y las pruebas de que su DNA está organizado en cromatina. Aunque los genes que codifican proteínas no tienen intrones, las arqueas presentan intrones en los genes de los tRNAs, como los eucariotas.

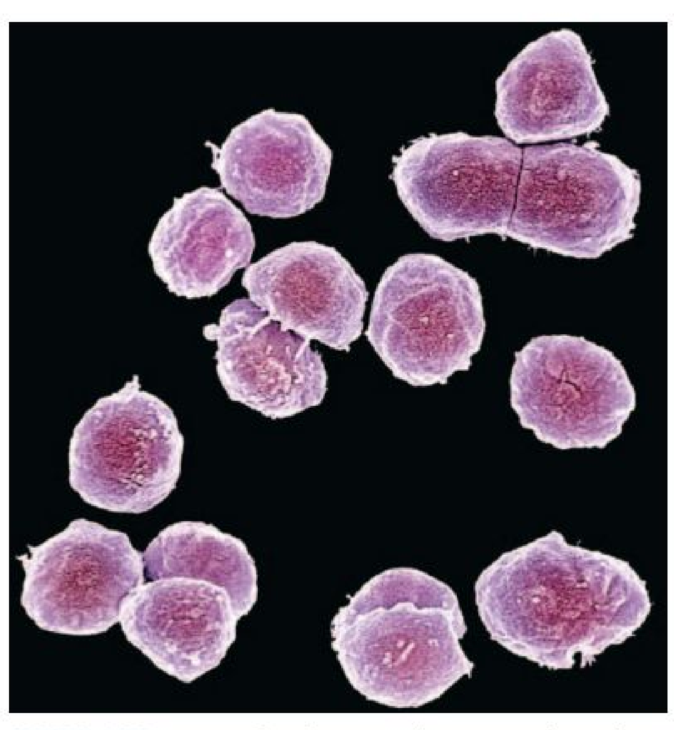


FIGURA 20.7 Micrografía electrónica de rastreo coloreada que muestra células de la arqueobacteria *Methanococcus jannashcii*, un procariota con tres cromosomas.

20.6 Los genes más eucarióticos tienen diversos patrones de organización

Aunque las características básicas del genoma eucariótico son parecidas en las distintas especies, su tamaño es muy variable (Tabla 20.6). El tamaño del genoma de estos organismos varía desde las aproximadamente 10 Mb en hongos hasta las más de 100.000 Mb en algunas plantas con flor (lo que representa un factor de magnitud de diez mil), y el número de cromosomas por genoma varía de dos a varios centenares (lo que representa un factor de magnitud de cien), pero el número de genes varía mucho menos que el tamaño del genoma o el número de cromosomas.

Características generales de los genomas eucarióticos

Comparados con los procariotas, los eucariotas presentan una densidad génica relativamente baja. La Figura 20.8 compara la densidad génica en regiones genómicas de *E. coli* con las de levadura, humanos y maíz. En general, los eucariotas más complejos tienen genomas menos compactos con una menor densidad génica. Si se comparan regiones de diferentes genomas eucarióticos se observan algunas características:

- **Densidad génica.** La región de 50 kb del cromosoma III del genoma de levadura de la Figura 20.8(b) contiene más de 20 genes, mientras que el segmento de 50 kb del cromosoma 16 del genoma humano de la Figura 20.8(c) contiene solo 6.
- **Intrones.** Ninguno de los genes de levadura que se muestran en la Figura 20.8(b) contiene intrones, mientras que la mayoría de los genes humanos si los contienen. De hecho, el genoma completo de levadura solo contiene 239 intrones, mientras que un solo gen del genoma humano puede contener más de 100.
- **Secuencias repetitivas.** La presencia de intrones y de secuencias repetitivas son la razón principal para la amplia gama de tamaños del genoma en los eucariotas. En algunas plantas, como el maíz, la presencia de secuencias repetitivas es la característica dominante de su genoma. El genoma de maíz tiene unas 2500 Mb de DNA, del cual más de dos terceras partes es DNA repetitivo, lo que resulta en una densidad génica muy baja en el genoma de esta especie [Figura 20.8(d)].

Unidades transcripcionales en el genoma de *C. elegans*

Aunque el genoma de los eucariotas comparte muchas características, las características genómicas específicas varían enormemente. El nemátodo *C. elegans* tiene un genoma de 97 Mb organizado en seis cromosomas, con un total de unos 20.000 genes[4]. La densidad génica es muy inferior que en levadura, unas 3 veces más genes y 8 veces más DNA, lo que representa una densidad media de 1 gen por cada 5 kb. Aproximadamente la mitad del genoma de *C. elegans* está formada de DNA espaciador intergénico, y una fracción importante de su genoma está formada por secuencias simples de DNA altamente repetitivas (secuencias como ATAT repetidas más de diez millares de veces).

La organización de los genes en el genoma de *C. elegans* difiere drásticamente de la de la mayoría de los otros eucariotas. Aproximadamente el 25 por ciento de sus genes están organizados en unidades transcripcionales policistrónicas, o

[4] *Nota del traductor:* análisis más recientes del genoma de este organismo parecen indicar que contiene entre 14.000 y 16.000 genes.

TABLA 20.6 TAMAÑO DEL GENOMA Y NÚMERO DE GENES EN EUCARIOTAS SELECCIONADOS

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)	Número de genes
S. cerevisiae (levadura)	12,1	6548
Plasmodium falciparum (malaria)	30	≈6500
C. elegans (nematodo)	97	>20.000
Arabidopsis thalania (planta de la mostaza)	120	≈20.000
D. melanogaster (mosca del vinagre)	170	≈16.000
Oryza sativa (arroz)	415	≈20.000
Zea mays (maíz)	2500	≈20.000
Homo sapiens (humano)	3300	≈25.000
Hordeum vulgare (cebada)	5300	≈20.000

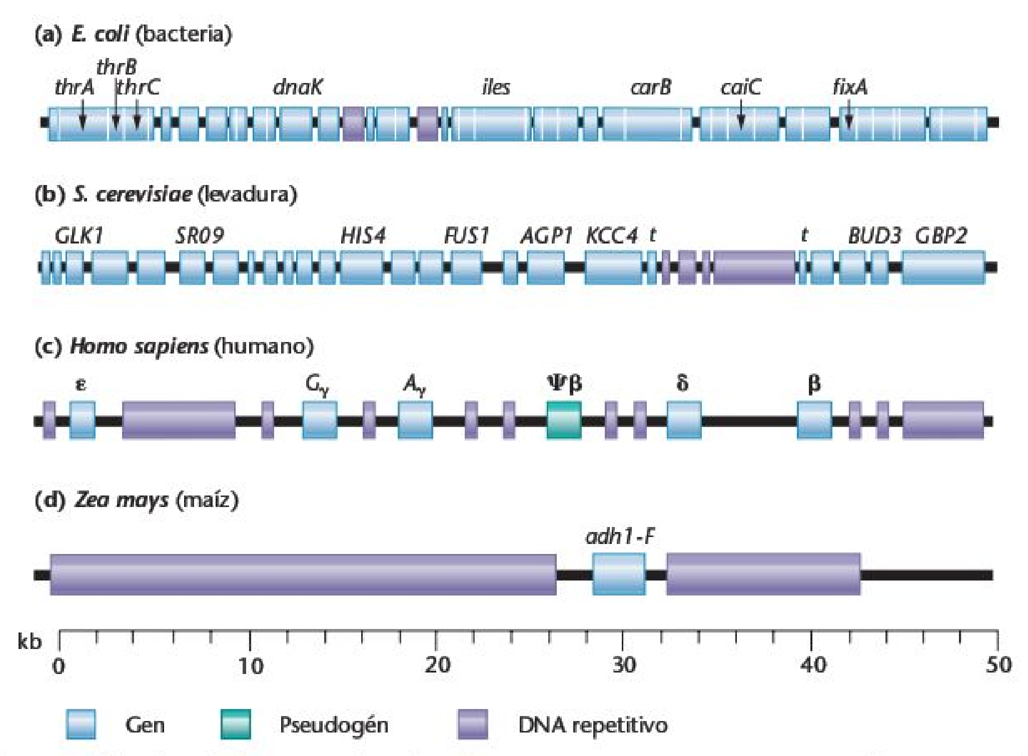


FIGURA 20.8 (a) En *E. coli,* la densidad génica es elevada, y hay muy pocas secuencias repetitivas. (b) Una región de 50 kb del cromosoma 3 de levadura que contiene más de 20 genes y poco DNA repetitivo. (c) Una región de 50 kb del cromosoma 11 humano que contiene 5 genes, 1 pseudogén y trechos de DNA repetitivo. (d) 50 kb del genoma del maíz que rodean al locus *Adh.* Este gen está rodeado por largos trechos de DNA repetitivo. En los eucariotas (b-d), la densidad génica es baja, y hay porciones del genoma que están ocupadas por secuencias de DNA repetitivas.

operones, como los bacterianos (Figura 20.9). Además, comparado con levadura, los genes de *C. elegans* tienen más intrones, unos cinco intrones por gen de promedio. De hecho, el 26 por ciento del genoma de *C. elegans* son intrones; además, muchos de sus genes se encuentran dentro de los intrones de otros genes (Figura 20.10).

Los genomas de las plantas superiores

Para los genéticos, la pequeña planta con flor *Arabidopsis thaliana* es la *Drosophila* del mundo vegetal (Figura 20.11). Su pequeño genoma, de 120 Mb distribuidas en 5 cromosomas, es comparable en tamaño al de *C. elegans* y *Drosophila*. Se ha estimado que contiene unos 20.000 genes, con una densidad génica de 1 gen por cada 5 kb, que también se parece a la de *C. elegans* y *Drosophila*. Al menos la mitad de sus genes están estrechamente relacionados con los encontrados en bacterias y en humanos. Debido a su genoma compacto, *Arabidopsis* es un organismo modelo para el estudio de otras plantas con genomas más grandes, como cereales económicamente importantes como el arroz, el maíz y la cebada.

El análisis de la secuencia nucleotídica de los cromosomas 2 y 4 de *Arabidopsis* revela un genoma dinámico. Ambos cro-

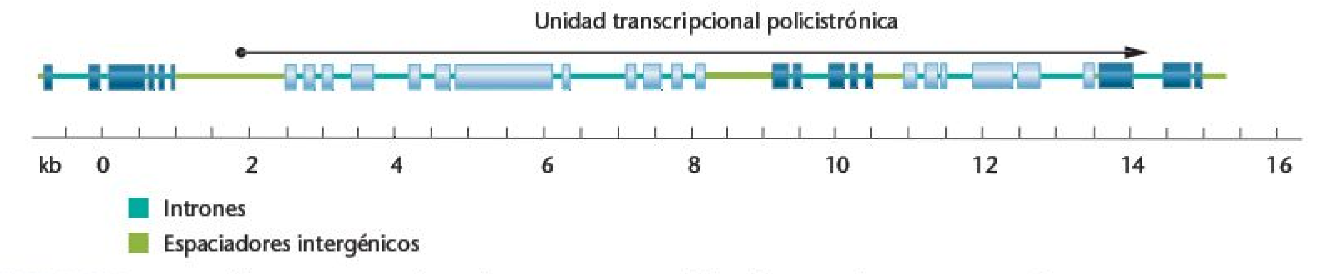


FIGURA 20.9 Región del cromosoma 3 de *C. elegans* que muestra la localización y la organización de cinco genes con intrones para cada gen, indicados con un color diferente. Los tres genes centrales forman parte de un operón y se transcriben como un grupo para formar un mRNA policistrónico. Los operones son comunes en los genomas bacterianos, pero poco frecuentes en los eucarióticos. En *C. elegans*, sin embargo, aproximadamente el 25 por ciento de los genes forman parte de operones.

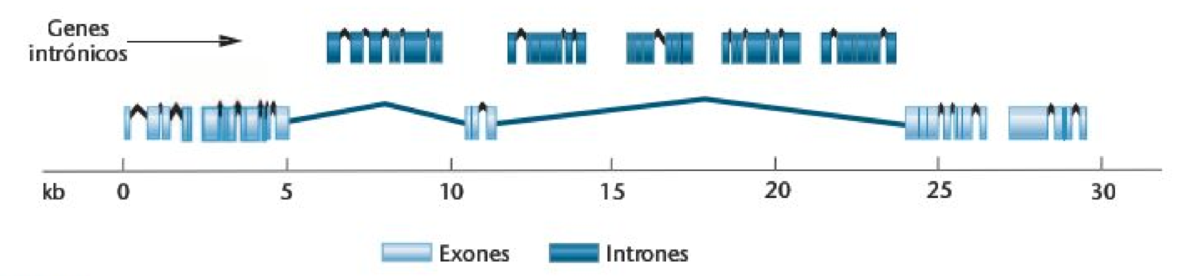


FIGURA 20.10 30 kb del genoma de *C elegans* que muestra la localización y la organización de diversos genes. El primer gen codifica una lipasa, abarca 25 kb y contiene dos grandes intrones. Los otros cinco genes se localizan dentro de los intrones del gen de la lipasa.

mosomas contienen muchas duplicaciones génicas en tándem (239 duplicaciones en el cromosoma 2, que implican 539 genes), y también duplicaciones más grandes que implican 4 bloques de secuencias de DNA, que abarcan 2,5 Mb. También hay algunas duplicaciones genómicas intercromosómicas; algunos genes del cromosoma 4 también están presentes en el 5. Las duplicaciones génicas y genómicas han desempeñado un papel importante en la evolución del genoma, como se discutirá en una sección posterior.



FIGURA 20.11 *Arabidopsis thaliana*, una pequeña planta que se usa como modelo genético para estudiar la organización genómica y el desarrollo de las plantas con flor.

Otras plantas, como el maíz y la cebada, tienen genomas cuyo tamaño es más de un orden de magnitud superior al de *Arabidopsis*, pero tienen aproximadamente el mismo número de genes (véase la Tabla 20.6). Los genes de estas plantas están agrupados en tramos de DNA separados por largos segmentos de DNA intergénico (Figura 20.12). En conjunto, estos grupos génicos (conocidos como espacio génico) sólo ocupan el 12-24 por ciento del genoma. En maíz, el DNA intergénico está formado principalmente por transposones. Puesto que las plantas estrechamente relacionadas a *Arabidopsis* tienen genomas más grandes pero un número similar de genes, se piensa que el pequeño genoma de *Arabidopsis* procede de una contracción genómica, en la que desaparecieron casi todas las regiones sin genes, junto con la mayor parte de las secuencias de los transposones. Además, también debe haber habido una reducción en el tamaño y el número de intrones, lo que justifica el tamaño compacto del genoma de esta planta.

20.7 El genoma humano: el Proyecto Genoma Humano (HGP)

El Proyecto Genoma Humano (HGP) amplia la tradición de cartografía genética iniciada por los genéticos durante los primeros años del siglo XX. El objetivo del análisis mutacional es la identificación y el cartografiado de todos los genes del genoma de un organismo. Este objetivo lo comparten también el HGP y todos los otros proyectos genoma, que utilizan la tecnología del DNA recombinante y la secuenciación de DNA en vez del análisis mutacional.

El HGP ha producido una enorme cantidad de información, gran parte de la cual todavía está siendo analizada e interpretada. Lo que está claro hasta ahora es que la información genómica de una amplia gama de organismos demuestra que los humanos y todas las otras especies comparten el mismo conjunto de genes esenciales para la función y la reproducción celular, lo que confirma que todos los seres vivos surgieron de un ancestro común. Estas relaciones evolutivas facilitan el análisis del genoma humano y el desarrollo de organismos modelo para estudiar enfermedades hereditarias humanas.

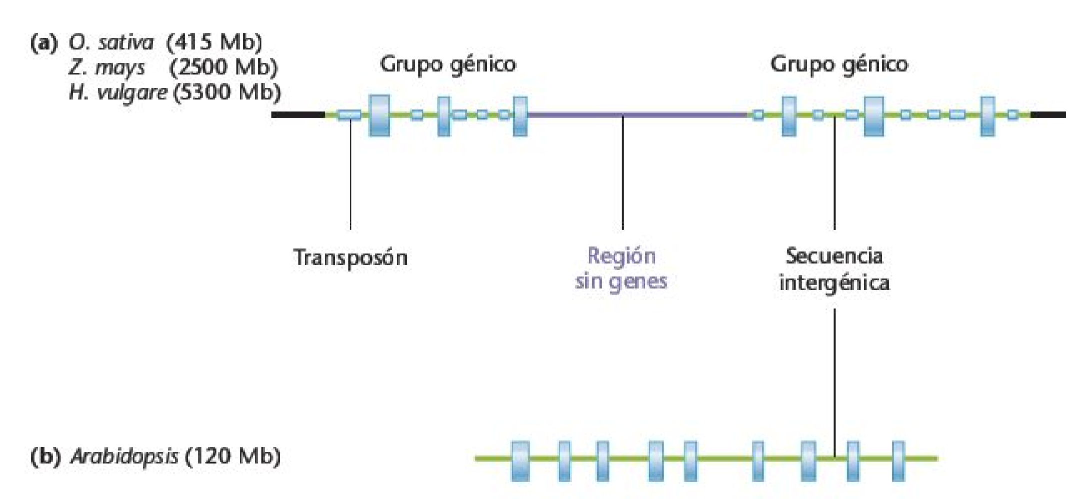


FIGURA 20.12 Organización del genoma en diversas plantas con genomas grandes y en el genoma compacto de *Arabidopsis*. (a) Los rectángulos verticales son genes localizados en grupos, separados por largos espacios sin genes formados por secuencias de DNA repetitivo. Dentro de los grupos génicos, los espacios intergénicos (en verde) contienen muchos transposones (pequeños rectángulos horizontales). (b) En el genoma de *Arabidopsis*, las regiones sin genes se han perdido, y los elementos transponibles se han reducido o perdido. El resultado es un genoma mucho más pequeño con genes que presentan una densidad mayor en todo el genoma.

Los orígenes del Proyecto Genoma Humano

En 1986 se propuso en los EEUU un proyecto para secuenciar el genoma humano, y en 1988 el Instituto Nacional de Salud (NIH, *National Institutes of Health*) y el Departamento de Energía de los EEUU formaron un comité conjunto para desarrollar un plan para este proyecto. El Proyecto Genoma Humano (HGP) empezó en 1990 bajo la dirección de James Watson, el codescubridor de la estructura de la doble hélice del DNA.

En vez de hallar y cartografiar marcadores y genes responsables de enfermedades de uno en uno, el HGP tenía la intención de secuenciar todo el DNA del genoma humano, identificar y cartografiar los miles de genes de los 24 cromosomas, y establecer la función de todos ellos. Para afrontar el impacto que esta información genética tendría en la sociedad, el HGP estableció el programa ELSI (Impacto Social, Legal y Ético) para asegurar la salvaguarda de la información genética y que ésta no se usaría en ningún tipo de discriminación. Una vez establecido en los EEUU, el HGP se vio rápidamente incrementado con programas de otros países que lo convirtieron en un esfuerzo internacional, especialmente Japón, Alemania e Inglaterra, todos coordinados por la Organización del Genoma Humano (HUGO).

Aunque no se refleja en el nombre, el Proyecto Genoma Humano también incluyó otros proyectos para secuenciar el genoma de los organismos modelo usados en experimentación genética. Estos organismos incluyen *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *M. musculus*.

El número de proyectos genoma se ha incrementado desde el inicio del HGP, y ya se han completado o están en vías de finalización literalmente centenares de proyectos de especies procarióticas y eucarióticas, muchas de las cuales son importantes en agricultura o causan enfermedades en plantas, animales o humanos. Hasta la actualidad ya se han secuenciado completamente los genomas de más de 125 especies, y se están secuenciando varios centenares más.

Las características principales del genoma humano

En junio del 2000, los responsables de los proyectos genoma público y privado se encontraron en la Casa Blanca y anunciaron conjuntamente la finalización de la secuencia borrador del genoma humano (Figura 20.13). En febrero del 2001, ambos grupos publicaron un análisis que cubría el 96 por ciento de la región eucromática del genoma. El trabajo restante de completar la secuencia llenando los huecos se completó en el año 2003, cuando se publicó la secuencia terminada. Actualmente la atención se dirige al análisis y a la interpretación de la gran cantidad de datos reunidos durante este proyecto. En la Tabla 20.7 se presentan las características principales del genoma humano.

Las tareas no terminadas de la secuenciación del genoma humano

A finales del año 2004 ya se había terminado más del 99 por ciento de la porción eucromática de la secuencia del genoma humano. En esta secuencia hay dos tipos de huecos. Hay unos 324 huecos en la porción eucromática del genoma, que abarcan unas 24 Mb de secuencia. La mayor parte de estas secuencias estás asociadas a regiones duplicadas del genoma que son difíciles de ensamblar. Los huecos principales están en las regiones heterocromáticas del genoma, incluyendo las regiones alrededor de los centrómeros, los genes ribosómicos y los telómeros, y cubren más de 200 Mb. Las regiones heterocromá-

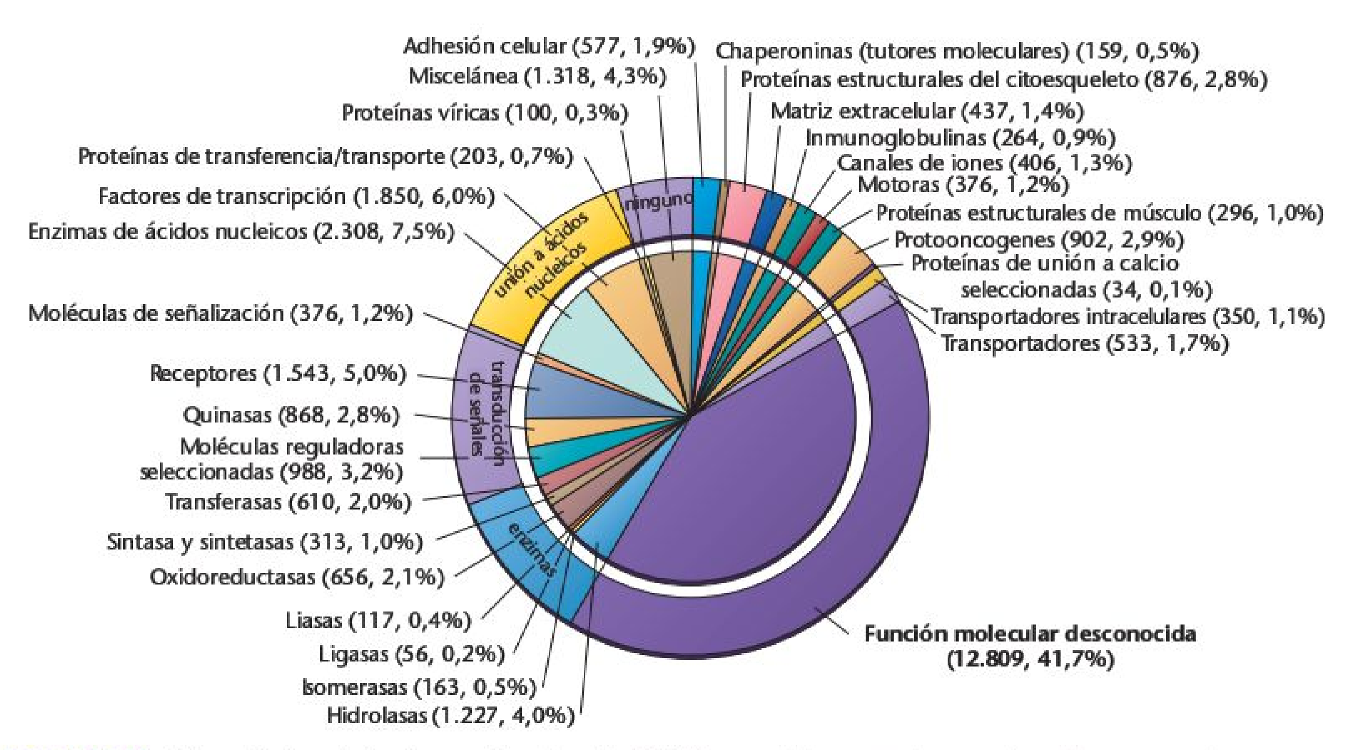


FIGURA 20.13 Lista preliminar de funciones asignadas a los 26.588 genes del genoma humano, basada en su semejanza a proteínas de función conocida. Entre los genes más comunes hay aquellos implicados en el metabolismo de los ácidos nucleicos (7,5 por ciento de todos los genes identificados), factores de transcripción (6,0 por ciento), receptores (5 por ciento), proteína quinasas (2,8 por ciento) y proteínas estructurales del citoesqueleto (2,8 por ciento). Un total de 12.809 proteínas (41 por ciento) no tienen ninguna función conocida, lo que refleja el trabajo que todavía queda por hacer para descifrar completamente nuestro genoma.

ticas del genoma humano fueron excluidas del proyecto genoma, por lo que estos huecos eran previsibles. Las regiones heterocromáticas contienen grandes grupos de secuencias de DNA repetidas en tándem con muy pocos genes, si es que contienen alguno. Aunque los brazos cortos de los cromosomas 13 a 15 y 21 y 22 son heterocromáticos y contienen grandes bloques de secuencias repetitivas, en ellos se han localizado unos cuantos genes. Estos dos tipos de huecos no están distribuidos aleatoriamente en el genoma (Figura 20.14), y a causa de las diferencias en tamaño y en contenido de secuencia, para rellenar todos los huecos se necesitarán posiblemente diversas estrategias.

TABLA 20.7 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL GENOMA HUMANO

- El genoma humano contiene más de 3 mil millones de nucleótidos, pero las secuencias que codifican proteínas sólo constituyen aproximadamente el 5 por ciento del genoma.
- Al menos el 50 por ciento del genoma procede de elementos transponibles, como LINE y secuencias *Alu*.
- El genoma humano contiene entre 25.000 y 30.000 genes, muchos menos de los 50.000-100.000 genes predichos.
- Más del 40 por ciento de los genes identificados no tienen ninguna función molecular conocida.
- Los genes no se distribuyen uniformemente en los 24 cromosomas humanos. Hay grupos ricos en genes, separados por «desiertos» con pocos genes, que justifican el 20 por ciento del genoma. Estos desiertos se correlacionan con las bandas G que se ven en los cromosomas teñidos. El cromosoma 19 es el que tiene una densidad génica mayor, y los cromosomas 13 e Y los que presentan una densidad génica menor.
- Los genes humanos son más grandes y contiene más intrones y de mayor tamaño que los genes de los genomas de invertebrados como *Drosophila*. El gen humano más grande conocido codifica la distrofina, una proteína muscular. Este gen, cuya forma mutante se asocia a la distrofia muscular, tiene una longitud de 2,5 Mb, mayor que muchos cromosomas bacterianos. La mayor parte de este gen está formada por intrones.
- El número de intrones en los genes humanos varía desde 0 (en los genes de las histonas) hasta 234 (en el gen de la titina, una proteína muscular).



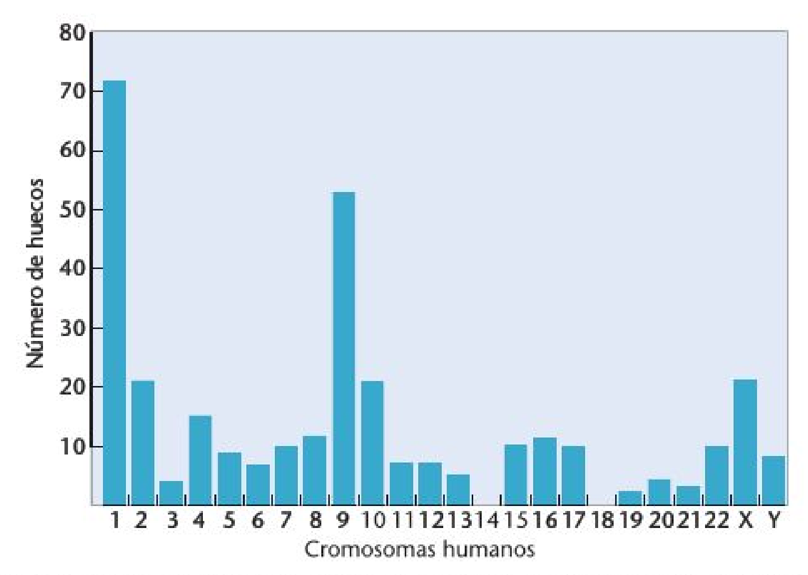


FIGURA 20.14 Distribución de huecos en la secuencia en todos los cromosomas humanos. En el 2004, sólo quedaban 300 huecos para cerrar, y sólo los cromosomas 14 y 18 estaban libres de ellos. Los investigadores usan diversos métodos para clonar y secuenciar el DNA de estos huecos. *De Eichler E., Clark R.A. She, X. 2004. An assessment of the sequence gaps: unfinished business in a finished human genome. Nature Reviews Genetics 5(5):345-54 copyright 2004 Macmillan Publishers Ltd.*

La organización cromosómica de los genes humanos

La organización de los genes de los brazos largos de los cromosomas 21 y 22 revela algunas características interesantes sobre el paisaje genético de los cromosomas humanos (Figura 20.15). Uno de los hallazgos más intrigantes es la diferencia de densidad génica entre estos dos cromosomas. La cantidad de secuencia presentada en estos cromosomas es parecida (33,65 Mb para el cromosoma 21 y 34,65 Mb para el cromosoma 22), pero el cromosoma 21 sólo tiene 225 genes (aproximadamente 1 gen por cada 150 kb de DNA) mientras que el cromosoma 22 tiene 541 genes (aproximadamente 1 gen por cada 64 kb de DNA).

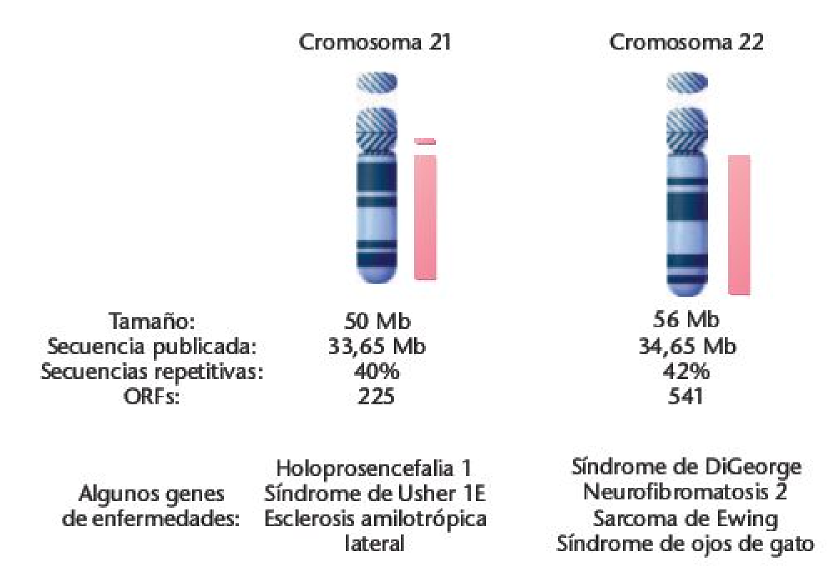


FIGURA 20.15 Cromosoma 21 humano (izquierda) y cromosoma 22 de chimpancé (derecha). Los dos cromosomas tienen un tamaño parecido (33,12 Mb para el cromosoma 21 humano y 32,7 Mb para el cromosoma 22 de chimpancé), y un contenido génico similar (284 genes en el cromosoma 21 humano y 272 genes en el cromosoma 22 de chimpancé). Estos cromosomas comparten 179 genes con secuencias codificantes cuya longitud es idéntica y los límites intrón-exón similares. Estos genes compartidos presentan, en promedio, una identidad nucleotídica y aminoacídica del 99,29% y del 99,18% respectivamente, lo que proporciona pruebas de la estrecha relación evolutiva entre estas dos especies.

Un examen más completo de la distribución de los genes de estos cromosomas revela que no están regularmente distribuidos (Figura 20.16). En el cromosoma 21, la región del brazo largo más cercana al centrómero tiene pocos genes, 1 gen por cada 304 kb de DNA de promedio. La región del brazo largo más cercana al telómero presenta una densidad génica mucho mayor, de 1 gen por cada 95 kb de DNA. Algunas regiones del cromosoma 21 están casi desprovistas de genes: una región que abarca 7 Mb incluye un solo gen, y hay tres regiones más de 1 Mb que no contienen ninguno. En conjunto, estas regiones con pocos genes suman 10 Mb, o lo que es lo mismo, un tercio de la longitud del brazo largo. El cromosoma 22 contiene una región de 2,5 Mb cerca del telómero y dos regiones más pequeñas (de aproximadamente 1 Mb cada una) localizadas en otras zonas que carecen de genes. Esta organización ayuda a explicar el hecho de que la mayor parte del genoma humano no contenga genes que codifiquen proteínas.

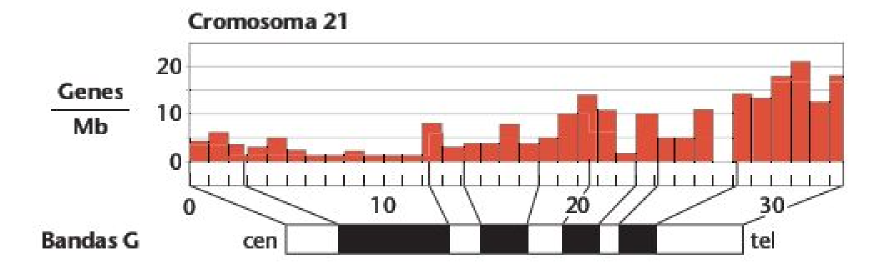
Tanto el cromosoma 21 como el 22 contienen regiones duplicadas. En el cromosoma 21 hay una región de 220 kb que se encuentra duplicada cerca de ambos extremos del brazo largo, y otra región de 10 kb se encuentra duplicada cerca del centrómero. En el cromosoma 22 hay un segmento de 60 kb duplicado. Un estudio de los puntos de rotura cromosómicos asociados con translocaciones y deleciones del cromosoma 21 indica que éstos se encuentran agrupados dentro y cerca de las regiones duplicadas, lo que sugiere que estas regiones pueden mediar sucesos implicados en estas aberraciones cromosómicas. El análisis futuro de las regiones duplicadas y de las secuencias repetitivas asociadas puede proporcionar una explicación molecular de la rotura de los cromosomas.

Nuestro genoma y el genoma de los chimpancés

El año 2004 se completó la secuencia nucleotídica del cromosoma 22 de los chimpancés. La comparación con el cromosoma 21 humano, su equivalente, ofrece algunas ideas interesantes sobre lo que hace que algunos primates sean humanos y otros chimpancés.

Los humanos y los chimpancés compartieron el último ancestro común hace unos 6 millones de años, y los dos genomas han evolucionado separadamente desde entonces. Este cromosoma de chimpancé y su ortólogo humano (se denominan ortólogos aquellos genes o cromosomas que descienden de un ancestro común) han acumulado sustituciones nucleotídicas que contabilizan el 1,44 por ciento de la secuencia total. La diferencia más sorprendente es el descubrimiento de 68.000 inserciones o deleciones (denominadas **indels**) en uno u otro cromosoma, lo que representa una frecuencia de 1 indel cada 470 bases. Muchas de estas indels son inserciones de secuencias *Alu* en el cromosoma humano 21. Aunque las diferencias en la secuencia total de estos cromosomas es pequeña, sólo el 17 por ciento de los genes analizados son idénticos en ambos cromosomas; el otro 83 por ciento codifica genes con una o más diferencias aminoacídicas.

Las diferencias físicas entre estos cromosomas (Tabla 20.8) y sus genes son solo una parte de la historia. Usando microordenaciones de DNA, los investigadores han comparado los patrones de expresión tisular de 202 genes del cromosoma humano 21 en células de cerebro y de hígado humanos y de chimpancé. Encontraron que 60 de estos genes se expresan en



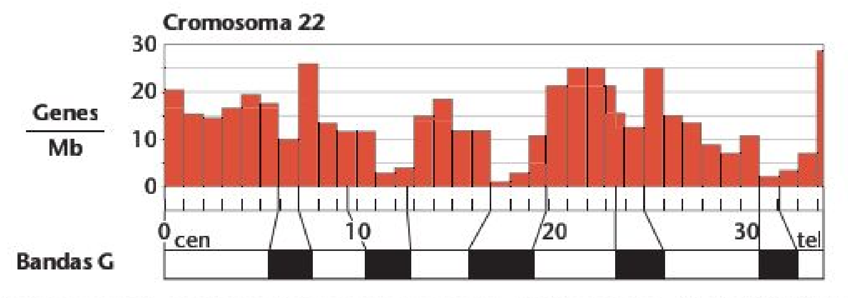


FIGURA 20.16 Densidad génica en el brazo largo de los cromosomas 21 y 22 (genes por Mb de DNA). En el cromosoma 21, la región que corresponde a la banda de tinción oscura es relativamente pobre en genes, y la región cercana al extremo del cromosoma es rica en genes. En el cromosoma 22, hay una pequeña región cerca del extremo del cromosoma que es pobre en genes, y otras dos regiones, cercanas el centrómero, que son relativamente pobres en genes.

TABLA 20.8 COMPARACIÓN ENTRE EL CROMOSOMA 21 HUMANO Y EL CROMOSOMA 22 DE CHIMPANCÉ

	Humano 21	Chimpancé 22
Tamaño (pb)	33,127,944	32,799,845
Contenido G + C	40.94	41.01
Islas CpG	950	885
SINES (elementos *Alu*)	15,137	15,048
Genes	284	272
Pseudogenes	98	89

el cerebro, y 40 en el hígado en una de estas dos especies. De éstos, 21 mostraban diferencias significativas en sus niveles de expresión. Algunos de estos genes desempeñan funciones importantes en el desarrollo del corazón, el cerebro y el sistema nervioso. Si el cromosoma 21 representa aproximadamente el 1 por ciento del genoma humano, entre estas dos especies hay miles de genes con diferencias potenciales en su secuencia aminoacídica o en sus patrones de expresión. Algunos de estos cambios pueden ser más cruciales que otros, y la comparación de toda la secuencia del genoma humano y del de chimpancé, y entre estas especies y otros primates, puede ayudar a identificar los genes que contribuyen a hacernos humanos.

20.8 La genómica comparativa es una herramienta versátil

La genómica comparativa, un nuevo campo de la biología que se desarrolla con rapidez, compara directamente la información genética de un organismo con la de otro. Es un campo con muchas aplicaciones tanto en ciencia básica como aplicada, incluyendo el descubrimiento de genes, el desarrollo de organismos modelo para enfermedades humanas, la elucidación de la historia evolutiva entre genes, genomas y especies, y la relación entre los organismos y su ambiente. La genómica comparativa usa una amplia gama de técnicas y recursos, incluyendo la construcción y utilización de bases de datos que contengan secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, técnicas citogenéticas de cartografía génica como hibridación *in situ* fluorescente (FISH), y métodos experimentales, como mutagénesis. La genómica comparativa utiliza estos recursos para identificar las semejanzas y las diferencias genéticas entre organismos, para determinar cómo estas diferencias contribuyen a las diferencias fenotípicas, de ciclo vital y de otros atributos, y para verificar la historia evolutiva de estas diferencias genéticas.

En las siguientes secciones se discutirán diversas aplicaciones de la genómica comparativa a diversos niveles (genes, cromosomas y genomas), así como también su función en la selección de sistemas modelo, en la evolución y en el descubrimiento de medicamentos.

El hallazgo de nuevos genes usando la genómica comparativa

La finalización de la secuencia del genoma humano eucromático ha facilitado la identificación y la catalogación de nuestros genes. Sin embargo, puesto que el 95 por ciento de nuestro genoma no codifica proteínas, para identificar los genes funcionales se deben rastrear vastos trechos de secuencia. El análisis de genómica comparativa usando el genoma humano y otros genomas puede ser útil para buscar secuencias en el genoma humano de genes todavía no identificados. Examinaremos un ejemplo de los muchos que han surgido de las comparaciones entre el genoma humano y el de ratón.

El brazo largo del cromosoma 11 humano contiene un grupo de cuatro genes (*APOAI-APOAIV*) que codifican apolipoproteínas. Estas proteínas controlan el nivel de lípidos y triglicéridos en sangre. Las mutaciones en estos genes alteran dramáticamente los niveles sanguíneos de lípidos, y son un factor importante en las enfermedades cardiovasculares. Para investigar si esta región del cromosoma 11 puede contener genes adicionales de apolipoproteínas, Edward Rubin y sus colaboradores compararon las secuencias humanas y de ratón de una región de 200 kb cercana al grupo génico *APOA* humano. Esta comparación identificó una pauta de lectura abierta en la secuencia humana que codifica una proteína de 366 aminoácidos, cuya secuencia presenta una alta homología con el gen *Apoav* de ratón y el gen *APOAIV* humano (Figura 20.17).

El análisis de la estructura proteica predicha reveló dominios con propiedades de unión a lípidos. Se clonó esta región del genoma humano y se utilizó en transferencias *northern* para identificar transcritos de RNA en los tejidos humanos, lo que confirmó que esta secuencia pertenece a un gen que se transcribe activamente. Los niveles de lípidos en sangre en ratones transgénicos que llevan este nuevo gen humano (*APOAV*) son solo de un tercio con respecto a los controles, mientras que los ratones *knockout* (de pérdida de función) que carecen del gen *Apoav* presentan niveles de lípidos en sangre cuatro veces superiores a los de los controles. Estos resultados experimentales demuestran la función importante de este gen humano recientemente identificado en el control del nivel de lípidos y de triglicéridos, un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares. Este descubrimiento también ilustra el poder de la genómica comparativa para identificar genes desconocidos con importancia funcional.

Los estudios de genómica comparativa que utilizan bases de datos de secuencias de cDNA clonadas de ratón han identificado diversos genes humanos asociados a enfermedades genéticas. La Tabla 20.9 enumera genes relacionados con enfermedades humanas que habían sido previamente cartografiados en *loci* cromosómicos, pero que todavía no habían sido aislados ni clonados. Mediante la cartografía computerizada de las secuencias de cDNA de ratón en las secuencias genómicas humanas, se identificaron los genes candidatos humanos de estas enfermedades. Estos genes candidatos se pueden confir-

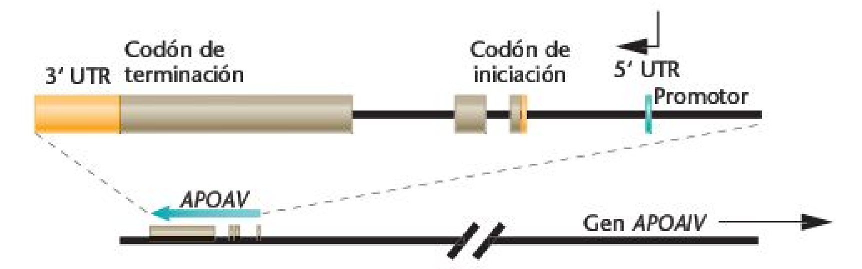


FIGURA 20.17 Organización del gen de la apolipoproteína humana (APOAV) que se identificó al comparar aproximadamente 200 kb de secuencia de DNA del brazo largo del cromosoma 11 con una secuencia de DNA del genoma de ratón. Esta región del cromosoma 11 contiene otras diversas apolipoproteínas, pero APOAV se identificó sólo comparando la secuencia humana y la de ratón, lo que enfatiza la importancia de los análisis de genómica comparativa. *Reproducido con permiso de Pennacchio L.A., et al., An Apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Science 294:169-173, Figure 1. Copyright 2001 AAAS.*

mar mediante el análisis de las mutaciones presentes en las familias afectadas y los estudios de sus árboles genealógicos, lo que engrosa el catálogo de genes clonados asociados a enfermedades genéticas humanas.

Genómica comparativa y organismos modelo

El análisis de un número cada vez mayor de secuencias genómicas confirma que todos los seres vivos están relacionados y descienden de un ancestro común. Todos los organismos utilizan grupos génicos parecidos para realizar las funciones celulares básicas, como la replicación del DNA, la transcripción y la traducción. Estas relaciones genéticas proporcionan la base para desarrollar y utilizar organismos modelo para estudiar enfermedades humanas hereditarias, y para analizar la interacción de los genes y el ambiente en las enfermedades complejas, como las enfermedades cardiovasculares y los desórdenes de comportamiento. Como ya se ha mencionado, estos organismos modelo incluyen levadura, *Drosophila*, *C. elegans* y ratón. Recientemente, se ha secuenciado y analizado el genoma de perro (Figura 20.18), lo que ha proporcionado otro valioso modelo para estudiar nuestro propio genoma.

Los perros ofrecen diversas ventajas para estudiar las enfermedades hereditarias humanas. Comparten muchas enfermedades genéticas con los humanos, incluyendo más de 400 enfermedades genéticas simples, aneuploidías de los cromosomas sexuales, enfermedades multifactoriales como la epilepsia, y la predisposición genética al cáncer.

TABLA 20.9 GENES DE ENFERMEDADES HUMANAS IDENTIFICADOS MEDIANTE GENÓMICA COMPARATIVA CON RATÓN

Enfermedad	Fenotipo
Síndrome de Meckel	Defectos en el sistema nervioso central
Defectos de tubo neural	Defectos en el tubo neural espinal
Síndrome de Wolk-Hisrchhorn	Falta de crecimiento físico y retardo mental
Spinulosa decalvans	Engrosamiento de la piel, pérdida de cabello
Convulsiones familiares benignas	Los ataques empiezan a los 6 meses de edad
Ataxia cerebelar de aparición infantil	Pérdida progresiva del equilibrio, sordera súbita
Neuromiopatía ventricular	Progressive muscle weakness
Tilosos con cáncer de esófago	Engrosamiento de la piel, desarrollo de cáncer de esófago en adultos

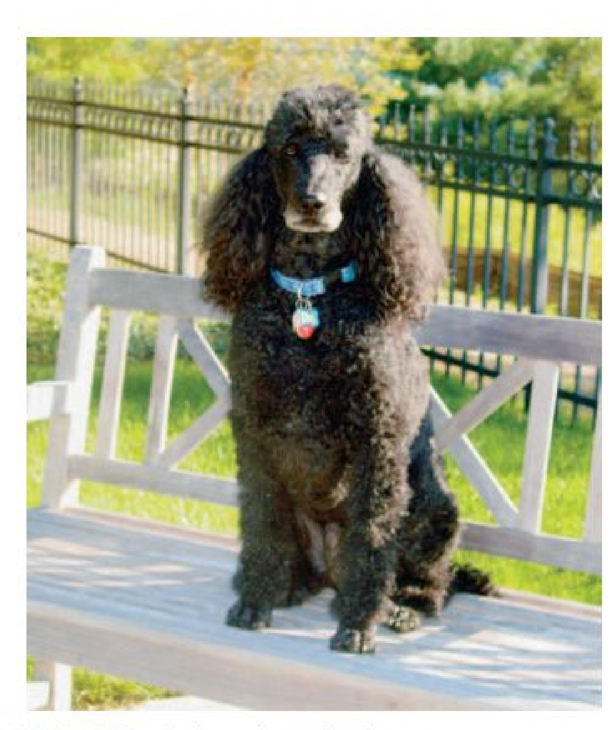


FIGURA 20.18 *Shadow,* el caniche de J. Craig Venter, cuyo DNA se usó para secuenciar el genoma de perro, ensamblado por Venter y sus colaboradores.

Para visualizar las homologías entre los genomas de especies diferentes se usa el pintado cromosómico comparativo, que utiliza sondas marcadas con fluorescencia de una especie hibridándolas sobre los cromosomas de la otra especie. Aproximadamente 90 bloques del genoma de perro pueden cartografiarse en los cromosomas humanos mediante FISH comparativo (Figura 20.19). Estos bloques contienen secuencias de DNA que presentan un alto grado de semejanza entre los genomas de perro y humano, lo que refleja la relación evolutiva entre estas dos especies.

El análisis de las secuencias genómicas indica que al menos el 60 por ciento de las enfermedades hereditarias de los perros tienen una causa molecular parecida o idéntica a las de los humanos, como mutaciones puntuales, deleciones, etc. Además, al menos el 50 por ciento de las enfermedades genéticas en los perros son específicas de raza, por lo que el alelo mutante segrega en un fondo genético relativamente homogéneo. Los perros de pura raza y las poblaciones humanas aisladas tienen en común el hecho de proceder de pocos fundadores y de haber experimentado un largo período de aislamiento genético relativo. Estas características facilitan la utilización de razas concretas como modelos de enfermedades genéticas humanas.

La disponibilidad de la secuencia del genoma de perro, el gran número de enfermedades genéticas en esta especie, y su semejanza molecular en las mutaciones de los genes humanos homólogos, convierten al perro en un modelo importante para la terapia génica humana. La terapia génica (que se discute en el Capítulo 22) trata una enfermedad genética mediante la transferencia de genes normales a células diana, donde se expresan para corregir el fenotipo anormal. La terapia génica para enfermedades debidas a un solo gen se ha utilizado ya con éxito en perros, y se puede usar este procedimiento para desarrollar y refinar los virus modificados utilizados como vectores para transferir las copias normales del gen en las células mutantes antes de intentar la terapia génica en humanos.

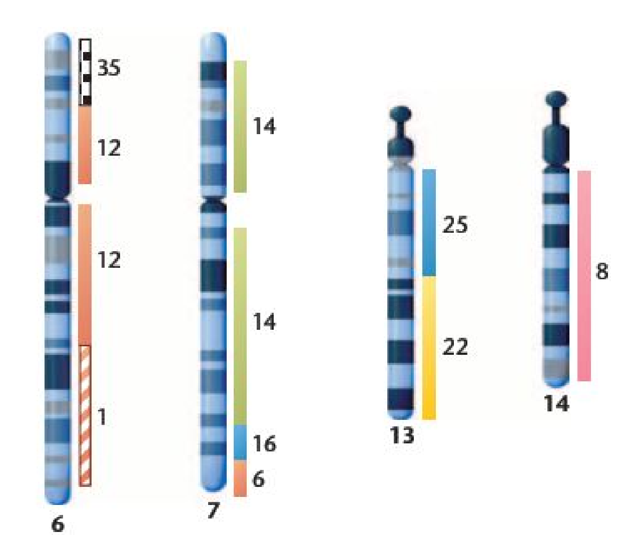


FIGURA 20.19 El pintado cromosómico, una variación de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), se ha usado para hallar segmentos homólogos en los cromosomas humanos y de perro. Estas homologías se pueden usar para comparar secuencias de DNA de perro y humanas para buscar genes en el genoma de ambas especies. El cromosoma 6 humano tiene secuencias que se encuentran en tres cromosomas de perro (1, 2 y 35). El cromosoma 7 humano está formado por secuencias que se encuentran en los cromosomas 6, 14 y 16 de perro. Los cromosomas acrocéntricos 13 y 14 humanos contienen secuencias que se encuentran en los cromosomas 22 y 25 de perro, y en el cromosoma 8 de esta especie, respectivamente.

Análisis comparativo de receptores nucleares y desarrollo de medicamentos

El análisis de las secuencias genómicas proporciona una oportunidad para estudiar los genes y los productos que codifican que median en la acción de los medicamentos. Los **receptores nucleares** (**NR**) son una superfamilia de factores de transcripción que regulan la transcripción de grupos de genes diana en respuesta a hormonas esteroideas. Más del 10 por ciento de los medicamentos recetados habitualmente actúan uniéndose a los NR.

La Figura 20.20(a) muestra los dominios que se encuentran en las proteínas NR típicas. Un grupo N-terminal variable, denominado AF1, es el responsable de la especificidad celular y del gen diana. En el centro se localiza un dominio de unión al DNA muy conservado con elementos de dedos de zinc. Cerca

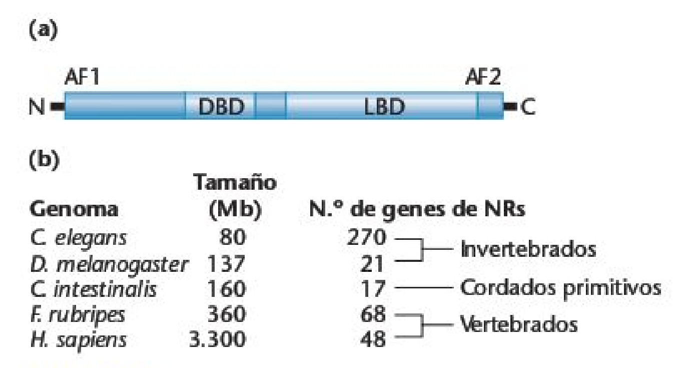


FIGURA 20.20 (a) Organización de los motivos y de los dominios codificados por les genes de receptores nucleares. AF1 es una secuencia que es vital para la especificidad celular y del gen diana. DBD es un dominio de unión al DNA muy conservado, que contiene dos regiones de dedos de cinc. La región DBD se une a secuencias genómicas específicas y determina que genes se activan. El LBD, el dominio de unión al ligando, activa el receptor nuclear cuando se une a una molécula señalizadora (el ligando). El motivo AF2 desempeña una función importante en la activación de la proteína receptora nuclear. (b) El análisis de genes de receptores nucleares de diversos organismos proporciona información importante sobre el tamaño, el número y la secuencia aminoacídica de les genes de receptores nucleares. Se están investigando las regiones muy conservadas de estos genes como dianas para medicamentos.

del extremo C-terminal hay un dominio de unión al ligando (LBD) que se une a las hormonas esteroideas. Junto con moléculas coactivadoras, las NR activadas remodelan la cromatina para facilitar la unión de los complejos de transcripción como primer paso a la activación de la expresión génica.

La comparación de los genes que codifican NRs en genomas humano y no humanos ha ayudado a catalogar las secuencias aminoacídicas requeridas para el reconocimiento del ligando. Esto proporciona información de la estructura tridimensional que se precisa para que un medicamento se una y active un NR. La genómica comparativa también identifica organismos modelo con NRs parecidos a los humanos. Estos organismos tendrán la misma respuesta a medicamentos específicos que los humanos, y se pueden usar para desarrollar nuevos medicamentos para tratar enfermedades humanas.

El receptor X-activado de farnesoid (FXR) es un regulador indispensable del metabolismo de lípidos. En 1995 se identificó el gen *FXR* humano. El análisis de secuencias genómicas reveló la presencia inesperada de un pseudogén *FXR* en el genoma humano. Los pseudogenes son versiones no funcionales de genes que se parecen en sus secuencias génicas, pero que contienen importantes sustituciones nucleotídicas, deleciones e inserciones que evitan su expresión.

Lo más sorprendente fue el descubrimiento que otros genomas de mamíferos contenían una segunda copia funcional del gen *FXR* (*FXRβ*). Este gen se coexpresa con el *FXR* en los tejidos embrionarios y adultos de ratón, pero se une a un grupo diferente de ligandos y activa un conjunto distinto de genes en respuesta a su unión. Esto significa que puede haber importantes diferencias entre los humanos y otros mamíferos respecto al metabolismo del colesterol y de otros lípidos, y que estos organismos pueden no ser buenos modelos para desarrollar nuevos medicamentos para controlar el nivel de lípidos en humanos.

Además, la clonación y la secuenciación del gen *FXRα* en hámsteres condujeron a la identificación de diversas variantes de corte y empalme con dominios de activación alterados. Los datos de las secuencias de las variantes de hámster se usaron para identificar las variantes humanas que se expresan diferencialmente en tejidos embrionarios y adultos, y que tienen distintos niveles de respuesta a determinados ligandos. Estos hallazgos indican que la regulación del metabolismo de los lípidos en los humanos es más compleja de lo que se creía, y que el análisis de genómica comparativa se ha convertido en una herramienta importante en el descubrimiento y el desarrollo de nuevos medicamentos.

El genoma mínimo para las células vivas

¿Cuál es el número mínimo de genes necesarios para mantener la vida? No podemos contestar completamente a esta pregunta sin definir antes qué significa organismo vivo, y hasta que sepamos las funciones de cada gen en los genomas que se han secuenciado. Muchos científicos definirían la vida como una célula de vida libre, es decir, una célula que pueda existir fuera de otro organismo. Aunque se desconoce el número mínimo de genes necesarios para mantener una vida independiente, podemos utilizar los pequeños genomas de los parásitos obligados para especular sobre este número mínimo de genes. Para ello, se puede comparar la información de la secuencia de los genomas bacterianos de *Mycoplasma genitalium* y *M. pneumoniae*, ambos patógenos parásitos humanos. Estos dos organismos estrechamente relacionados se encuentran entre los procariotas autorreplicativos más sencillos conocidos, y pueden servir como sistemas modelo para entender las funciones esenciales de una célula autorreplicativa. *M. genitalium* tiene un genoma de 580 kb, mientras que el de *M. pneumoniae* es de 816 kb. Ambos pertenecen a un grupo de bacterias que carecen de pared celular y que invaden otros organismos, causando a menudo enfermedades en una amplia gama de huéspedes, incluyendo insectos, plantas y humanos. (En los humanos, estas bacterias causan infecciones genitales y respiratorias.)

El genoma de *M. genitalium* tiene 480 genes que codifican proteínas, lo que representa el genoma bacteriano más pequeño de entre los casi 100 genomas secuenciados hasta la fecha. El genoma de la otra especie relacionada, *M. pneumoniae*, tiene estos 480 genes y otros 197 genes adicionales, lo que hace un total de 677 genes codificantes de proteínas. En contraste, el genoma de *Haemophilus influenzae* (el primer genoma bacteriano secuenciado), de 1,8 Mb, tiene 1703 genes. La Tabla 20.10 resume las funciones de algunos genes en estas bacterias, y las compara con los de *E. coli*.

La disponibilidad de secuencias genómicas permite que nos preguntemos si los 480 genes que tiene *M. genitalium* (y que son compartidos con *M. pneumoniae*) se acercan al conjunto mínimo de genes necesarios para la vida. En otras palabras, ¿la vida se puede definir en términos de un número de genes específicos? Para responder a esta pregunta, se puede usar una combinación de métodos comparativos y experimentales. La aproximación comparativa se basa en la premisa de que es probable que los genes compartidos por organismos alejados sean esenciales para la vida. Comparando los conjuntos de genes compartidos por diferentes organismos, sería posible catalogar los que están compartidos y desarrollar una lista de genes necesarios para la vida.

M. genitalium y *H. influenzae* compartieron el último ancestro común hace unos 1.500 millones de años. Los genes que todavía compartan estas dos especies deberían representar los que son esenciales para la vida. Al comparar las secuencias nucleotídicas de los 480 genes de *M. genitalium* con los 1703 genes de *H. influenzae*, los investigadores identificaron 240 genes ortólogos entre las dos especies. Los genes **ortólogos** son aquellos que descienden de un gen ancestral común que tiene la misma función en especies diferentes. Además de los 240 genes compartidos, se identificaron 16 genes cuyas secuencias son diferentes pero que realizan la misma función. Estos genes representan funciones esenciales que son realizadas por genes no ortólogos. Así, usando solo genómica comparativa, parece ser que estos 256 genes puedan representar el conjunto mínimo de genes necesarios para la vida.

TABLA 20.10 FUNCIONES GÉNICAS EN *M. GENITALIUM*, *H. INFLUENZAE* Y *E. COLI*

Clase funcional	*E. coli*	*M. genitalium*	*H. influenzae*
Genes codificantes de proteínas	4.288	470	1.727
Replicación y reparación del DNA	115	32	87
Transcripción	55	12	27
Traducción	182	101	141
Proteínas de regulación	178	7	64
Biosíntesis de aminoácidos	131	1	68
Biosíntesis de ácidos nucleicos	58	19	53
Metabolismo de lípidos	48	6	25
Metabolismo energético	243	31	112
Incorporación y transporte de proteínas	427	34	123

Fuente: Blattner, F., et al. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–62. Table 4, p. 1458; Fraser, C.M., et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397–403. Table 2, p. 400.

Craig Venter y sus colaboradores utilizaron una aproximación experimental para determinar cuántos de los 480 genes de *M. genitalium* son esenciales para la vida. Utilizaron transposones para mutar genes de esta bacteria de manera selectiva. Las mutaciones en genes esenciales produjeron fenotipos letales, pero si el gen no era esencial su mutación no afectaba la viabilidad. En esencia, mutaron los genes de uno en uno mediante la inserción de un transposón, y si el fenotipo era letal, clasificaban el gen como esencial. Encontraron que muchos de los 480 genes no eran esenciales, y que el conjunto mínimo de genes para *M. genitalium* es de unos 265-300 genes. Este resultado es muy parecido a los 256 genes necesarios procedentes del análisis de genómica comparativa.

Ahora resuelva esto

El Problema 20.22 de la página 599 implica la pérdida diferencial de genes en miembros del género procariótico Buchneria.

Sugerencia: Recuerde que todos los organismos simbiontes coevolucionan con sus huéspedes.

El hecho de que a menudo las células activan diferentes grupos de genes cuando se exponen a distintas condiciones complica la búsqueda del grupo génico mínimo necesario para la vida. En consecuencia, puede que el grupo mínimo de genes necesarios para los organismos parásitos sea diferente al de los organismos simbiontes y al de los organismos de vida libre. Para definir la vida a nivel molecular de una manera mucho más directa, Venter ha iniciado un proyecto para desarrollar y probar un genoma sintético. Este proyecto tiene que superar varios obstáculos formidables. El primero es seleccionar qué genes deberían incluirse en el genoma. El siguiente es sintetizar un genoma que contenga diversos cientos de miles de nucleótidos. Una vez sintetizado, este equipo planea destruir el DNA de una célula de *M. genitalium* e insertar en ella el genoma sintético. Se desconoce si los componentes citoplasmáticos reconocerán y activarán el genoma sintético, pero si tiene éxito, Venter y sus colaboradores habrán definido la vida a nivel molecular, lo que generará preguntas éticas sobre la creación de formas de vida.

20.9 Genómica comparativa: las familias multigénicas diversifican la función génica

Los genes que pertenecen a familias multigénicas comparten secuencias de DNA similares pero no idénticas, como resultado de su linaje con mutación a partir de un único gen ancestral. Con frecuencia sus productos génicos tienen funciones parecidas, y a menudo, pero no siempre, sus genes se encuentran juntos en una misma localización en el cromosoma. Para ver cómo el análisis de las familias multigénicas proporciona ideas sobre la organización y la evolución del genoma eucariótico, primero examinaremos casos en los que un grupo de genes codifican cadenas polipeptídicas muy similares pero no idénticas que terminan formando parte de proteínas con funciones estrechamente relacionadas. Las múltiples proteínas que surgen de la duplicación de un único gen se denominan **parálogas**. La familia génica de la globina, responsable de codificar los diversos polipéptidos de las moléculas de hemoglobina, es un ejemplo de familia multigénica paráloga que surgió por duplicación y dispersión a diferentes sitios cromosómicos.

Duplicaciones génicas

El prácticamente ininterrumpido flujo de datos de secuencias de los proyectos genoma está proporcionando evidencias de que

las familias multigénicas están presentes en muchos genomas, si no en todos. Además de las amplias duplicaciones genómicas, pequeños bloques de genes y genes individuales pueden duplicarse mediante diversos mecanismos. Un entrecruzamiento desigual es un suceso de recombinación entre miembros de un par de cromosomas homólogos en que un segmento de DNA se duplica en uno de los productos de la recombinación (Capítulo 8).

Una vez se han generado, los miembros de las familias multigénicas pueden permanecer unidos en un mismo cromosoma o pueden dispersarse a otras partes del genoma. Hay varios mecanismos que pueden conducir este proceso, incluyendo inversiones, translocaciones y la transposición de elementos móviles (Capítulo 13).

La filogenia molecular ha trazado el linaje y las relaciones entre los miembros de las familias génicas. Uno de los ejemplos mejor estudiados de divergencia es la superfamilia génica de las globinas (Figura 20.21). En esta familia, hace unos 800 millones de años se produjo la duplicación de un gen ancestral que codificaba una proteína de transporte de oxígeno. Esto produjo dos genes hermanos, uno de los cuales evolucionó en el gen de la mioglobina actual. (La mioglobina en una proteína transportadora de oxígeno que se encuentra en músculo.) El otro gen se convirtió en el gen de la globina ancestral. Hace unos 500 millones de años, el gen ancestral de la globina se duplicó y formó los prototipos de las subfamilias génicas de la α y la β-globina. Los genes de la **α-globina** y de la **β-globina** codifican las proteínas que se encuentran en la hemoglobina, la molécula que transporta el oxígeno en los glóbulos rojos. Durante los últimos 200 millones se produjeron nuevas duplicaciones de estos genes. Sucesos posteriores dispersaron los miembros de esta superfamilia, y actualmente cada subfamilia reside en un cromosoma diferente.

Se observan patrones de evolución similares en otras familias génicas, incluyendo la familia de proteasas de la tripsina-quimotripsina, los genes homeóticos selectores de los animales y la familia de la rodopsina de los pigmentos visuales.

La evolución de las familias génicas: los genes de las globinas

Los genes de la α-globina y de la β-globina humanos son dos de las regiones más intensamente estudiadas del genoma humano. Las proteínas codificadas por estos genes son componentes de la hemoglobina. La hemoglobina adulta es un tetrámero que contiene dos polipéptidos α y dos polipéptidos β (Figura 20.22). Cada polipéptido incorpora un grupo hemo que une oxígeno de manera reversible. En el brazo corto del cromosoma 16 hay un grupo de 3 genes α-globina, y en brazo corto del cromosoma 11 hay otro grupo con 5 genes β-globina. La secuencia nucleotídica de los miembros de ambas familias es similar, pero los que comparten una mayor similitud de secuencia son los miembros de una misma subfamilia (Figura 20.23).

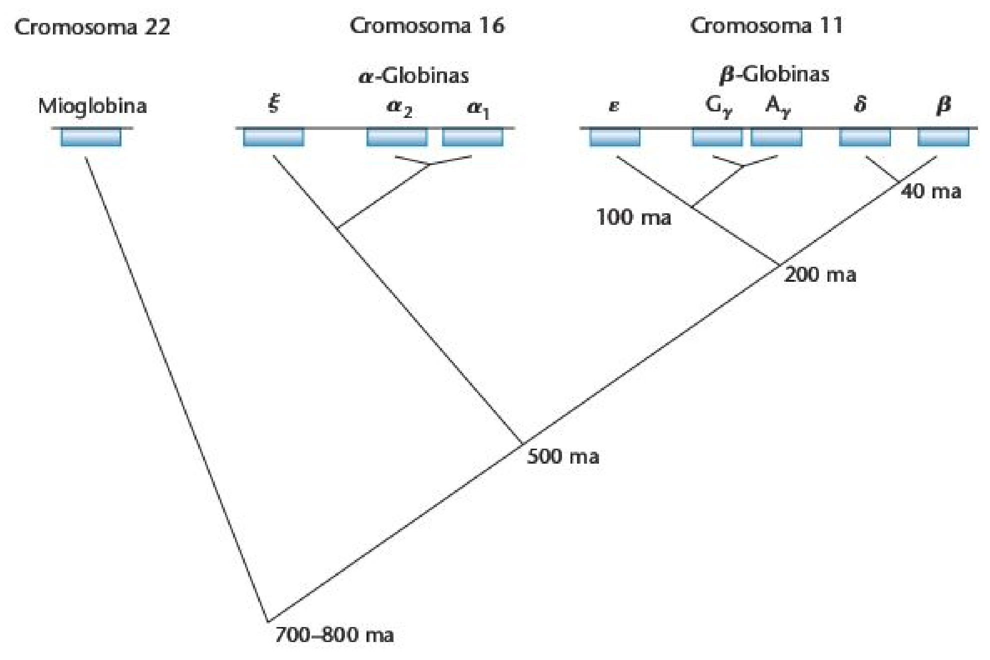


FIGURA 20.21 Historia evolutiva de la superfamilia génica de las globinas. Hace unos 700-800 millones de años (ma), un suceso de duplicación en un gen ancestral originó dos linajes. Una línea condujo al gen de la mioglobina, que en humanos se localiza en el cromosoma 22; la otra línea experimentó un segundo suceso de duplicación hace unos 500 ma, generando los ancestros de las subfamilias de la α- y la β-globinas. Hace 200 ma, nuevas duplicaciones formaron las subfamilias del gen de la β-globina. En los humanos, los genes de la α-globina se localizan en el cromosoma 16, y los de la β-globina en el cromosoma 11.

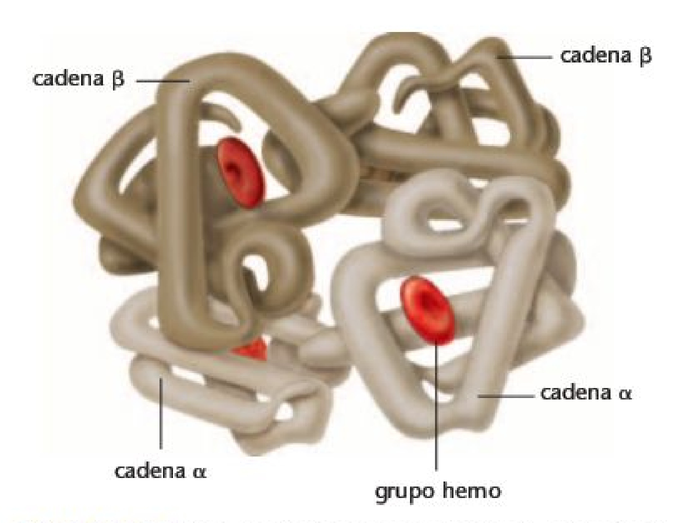


FIGURA 20.22 Cada molécula de hemoglobina funcional está formada por dos cadenas alfa y dos cadenas beta, cada una de las cuales transporta un grupo hemo.

Dentro de cada subfamilia, los genes se activan y desactivan coordinadamente durante los estadios de desarrollo embrionario, fetal y adulto (Figura 20.24). Para los miembros de ambas subfamilias, esta expresión ocurre en el mismo orden en que los genes se ordenan en el cromosoma.

La subfamila génica de la α-globina [Figura 20.25(a)] abarca más de 30 kb y contiene 3 genes: el gen dseta (ζ), que se expresa al inicio de la embriogénesis; y dos copias del gen α, que se expresan durante los estadios fetal (α_1) y adulto (α_2). Además, este grupo también contiene dos pseudogenes (ζ y α_1). Los pseudogenes se designan con el prefijo ψ (psi), seguido por el símbolo del gen a quien más se parezca. Así, la denominación α_1 indica un pseudogén del gen α_1 adulto.

La organización de los miembros de la subfamilia génica de la α-globina y la localización de sus intrones y exones revela diversas características. Primero, como es habitual en los eucariotas, el DNA que codifica los tres genes a funcionales solo ocupa una pequeña porción de la región que contiene la subfamilia. La mayor parte del DNA de esta región es DNA espaciador intergénico. Segundo, cada gen funcional de esta subfamilia contiene dos intrones localizados exactamente en las mismas posiciones. Tercero, las secuencias nucleotídicas de los exones correspondientes son casi idénticas en los genes ζ y α. Ambos genes codifican cadenas polipeptídicas de 141 aminoácidos. Sin embargo, sus secuencias intrónicas son muy divergentes, a pesar de que tiene aproximadamente el mismo tamaño. Obsérvese que buena parte de la secuencia nucleotídica de estos genes forma parte de estos intrones no codificantes.

El grupo génico de la β-globina humana es más grande que el de la α-globina, y contiene cinco genes distribuidos en más de 60 kb de DNA [Figura 20.25(b)]. Como sucede en la subfamilia génica de la α-globina, el orden de los genes en el cromosoma coincide con el orden de expresión durante el desarrollo. De los cinco genes, tres se expresan antes del nacimiento. El gen ε (epsilon) se expresa sólo durante la embriogénesis, mientras que los dos genes γ (G_γ y A_γ), que son casi idénticos, solo se expresan durante el desarrollo fetal. Los productos polipeptídicos de ambos genes γ difieren en un solo aminoácido. Los dos genes restantes, δ y β, se expresan tras el nacimiento. Finalmente, esta subfamilia también contiene un pseudogén, $\psi\beta_1$. Todos los genes funcionales de este subgrupo codifican proteínas de 146 aminoácidos y tienen dos intrones de tamaño similar en idéntica posición. El segundo intrón de los genes de la β-globina es significativamente más grande que su correspondiente en los genes funcionales de la α-globina. Estas semejanzas reflejan la historia evolutiva de cada subfamilia y los sucesos de duplicación génica, sustitución nucleotídica y translocaciones cromosómicas que han producido la superfamilia actual de las globinas.

20.10 La proteómica identifica y analiza las proteínas de una célula

El término **proteoma** es una palabra relativamente nueva que define el conjunto completo de proteínas codificadas por un genoma. En un sentido más restrictivo, puede usarse para describir el conjunto de proteínas expresadas por una cé-

α-globina V–LSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF–DLSH
β-globina VHLTPEEKSAVTALWGKV––NVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLST

α-globina –––GSAQVKGHGKKVA–DALTNAVAHVDD–MPNALSALSDLHAHKLRVDPVN
β-globina AVMGNPKVKAHGKKVL–GAFSDGLAHLDN–LKGTFATLSELHCDKLHVDPEN

α-globina LLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR – 141
β-globina LLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH – 146

FIGURA 20.23 Secuencia aminoacídica de los genes de la alfa (α) y la beta (β) globinas usando el código de una letra para designar a los aminoácidos (véase la Figura 14.16). Las áreas sombreadas indican aminoácidos idénticos. Los dos genes descienden de un ancestro común, y divergieron hace unos 500 millones de años.

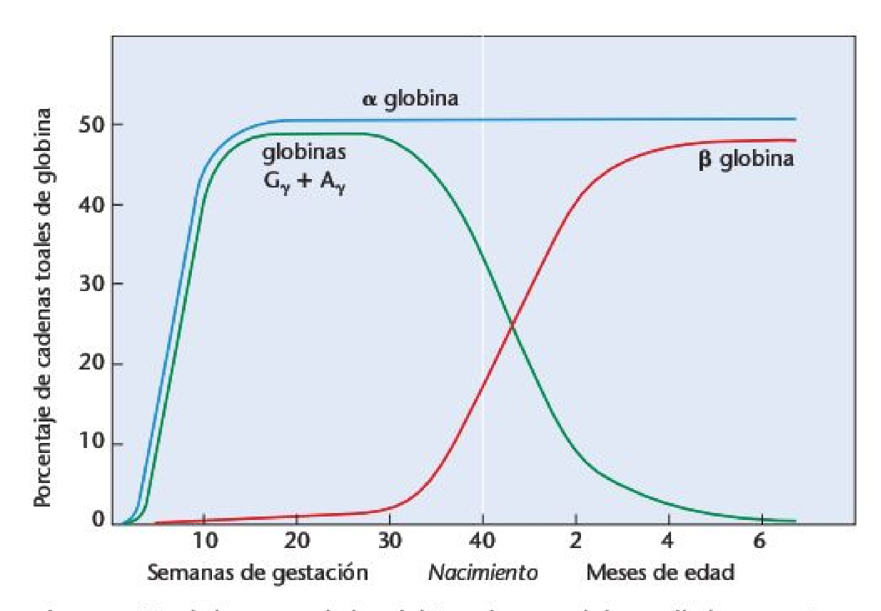


FIGURA 20.24 Cambios en la expresión de los genes de las globinas durante el desarrollo humano. Los genes alfa se conectan al inicio del desarrollo, y continúan conectados durante toda la vida. Los miembros Gγ y Aγ de la familia beta se expresan durante el desarrollo fetal, y se desconectan justo antes del nacimiento. El gen de la β-globina se conecta justa antes del nacimiento y se expresa durante toda la vida.

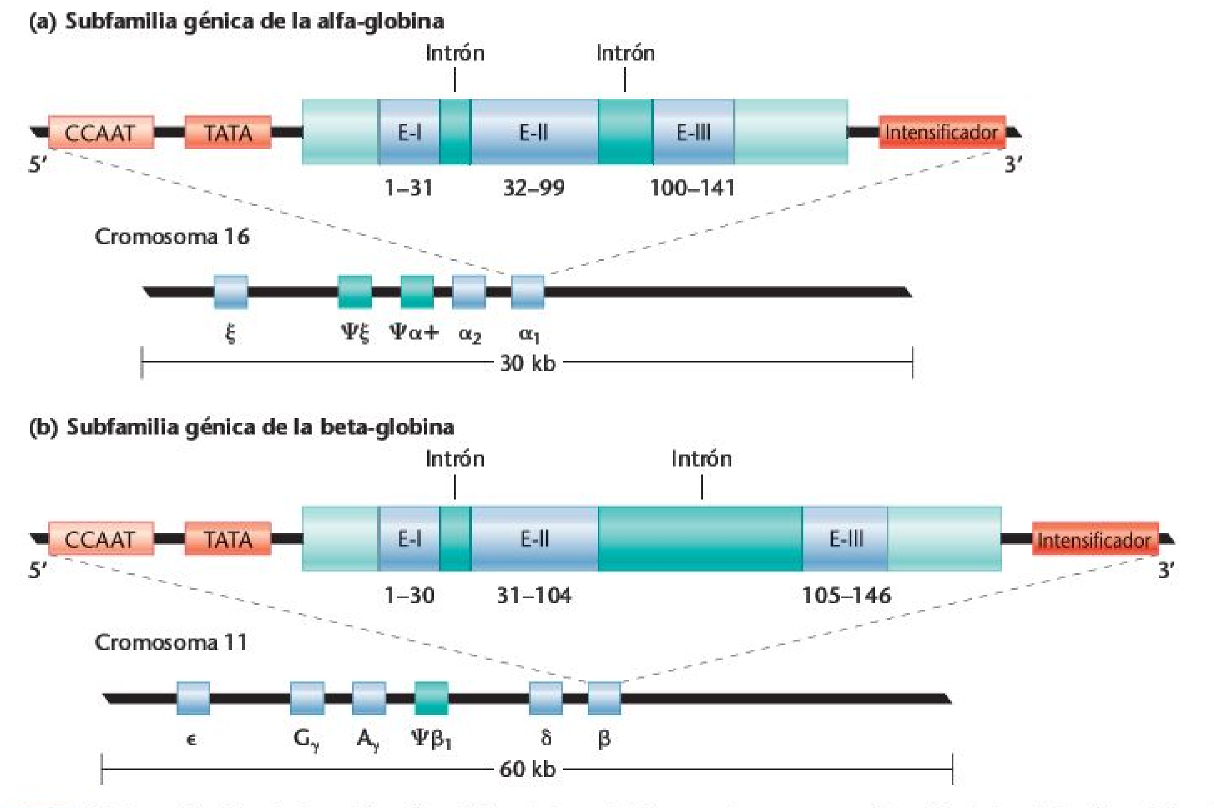


FIGURA 20.25 (a) Organización de la subfamilia génica de la α-globina en el cromosoma 16, y (b) de la subfamilia génica de la β-globina en el cromosoma 11. También se muestra la organización interna de los genes α_1 y β. Cada gen contiene tres exones (E-I, E-II y E-III) y dos intrones. Los números debajo de los exones indican los aminoácidos codificados por cada exón.

lula en un momento dado[5]. A medida que los proyectos genoma van proporcionando información sobre el número y el tipo de genes presentes en los genomas procarióticos y eucarióticos, la cuestión de la función proteica se va convirtiendo en el tema central de la biología. Como se dijo con anterioridad, en la mayoría de los genomas secuenciados hasta la fecha, se desconoce la función de muchos de los genes recién descubiertos. A otros solo se les presupone una función, que se les asigna por su homología con genes conocidos a partir de la comparación de secuencias en bases de datos, sin pruebas experimentales conseguidas en experimentos de laboratorio. Por ejemplo, en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, se desconoce la función de más de la mitad de los genes codificados en sus respectivos genomas. En el genoma humano, aproximadamente el 41 por ciento de los genes no tienen una función conocida.

La reconciliación entre el número de genes y el número de proteínas

A medida que se dispone de más datos de las secuencias de los eucariotas, se hace evidente que la complejidad de un organismo no está necesariamente relacionada con el número de genes de su genoma. Por ejemplo, ¿cómo es que *Drosophila* tiene menos genes que el nemátodo *C. elegans*, que es menos complejo? O, mirando en la otra dirección, ¿cómo es que *C. elegans* tiene casi tantos genes como los humanos? La respuesta a estas preguntas implica entender la función génica. En la era pregenómica, la función génica se equiparaba con la identificación de un producto génico codificado. Sin embargo, la secuenciación ha revelado que a menudo la relación entre gen y producto génico es compleja. Los genes pueden tener múltiples sitios de inicio de la transcripción, que producen varios tipos distintos de transcritos. El corte y empalme alternativo y la edición de las moléculas de pre-mRNA pueden generar docenas de proteínas diferentes a partir de un único gen. En conjunto, se estima que el 40-60 por ciento de los genes humanos producen más de una proteína por procesamiento alternativo.

Una vez hechos, muchos productos génicos son modificados mediante el corte de sus extremos (como secuencias de señalización, propéptidos o los residuos metionina iniciadores), la adición de grupos químicos (e.g. metil, acetil fosforil) o uniéndose a azúcares y lípidos. Las proteínas se unen interna y externamente, y en algunos casos interesantes pero poco frecuentes, incluso se procesan para eliminar secuencias aminoacídicas internas (denominadas **inteínas**). Se conocen más de cien mecanismos de modificación postraduccional. El análisis de la función proteica se ve dificultado por el hecho de que muchas proteínas trabajan vía interacciones proteína-proteína, o como parte de un complejo molecular más grande. Así, el genoma humano, que tiene 25.000-30.000 genes codificantes, tiene la capacidad de producir varios cientos de miles de productos génicos diferentes. La proteómica se usa para reconciliar las diferencias entre el número de genes de un genoma y el número de proteínas observadas en las células. La proteómica proporciona información sobre la función de la proteína, su estructura, las modificaciones postraduccionales las interacciones proteína-proteína, la localización celular, sus variantes, y las relaciones (dominios compartidos, historia evolutiva) con otras proteínas, para cada proteína codificada en el genoma.

La tecnología proteómica

La proteómica utiliza técnicas para separar e identificar las proteínas aisladas de las células. La combinación de técnicas que se utilizan más a menudo implica un gel de electroforesis bidimensional (2DGE) y la espectrometría de masas (MS). En el 2DGE (Figura 20.26), las proteínas extraídas de una célula se cargan en un gel de poliacrilamida y, en la primera dimensión se separan según su carga eléctrica. Después, el gel se rota 90° y, en la segunda dimensión, las proteínas se separan según su peso molecular. Al teñirse los geles, las proteínas se muestran como manchas; los geles típicos muestran de 200 a 10.000 manchas (Figura 20.27). Entonces deben identificarse las proteínas aisladas por 2DGE. En el pasado, las proteínas se identificaban por su unión a un anticuerpo, o por fragmentación y análisis paso a paso hasta producir la secuencia aminoacídica. Estos métodos, que precisaban mucho tiempo y trabajo, no son útiles para analizar los cientos o los miles de proteínas que se pueden aislar de una célula.

Para acelerar y automatizar el proceso, se desarrollaron nuevas técnicas de espectrometría de masas, que permiten determinar con precisión la masa de moléculas grandes (Figura 20.28). Uno de estos métodos se denomina **ionización por láser asistida por matriz (MALDI)**. Este procedimiento tiene varios pasos. Primero, se digiere una proteína aislada mediante un gen 2D con la enzima tripsina, lo que produce un conjunto característico de fragmentos peptídicos. Se analiza cada fragmento por MALDI, lo que produce una huella de la masa del péptido. Segundo, se utiliza un algoritmo de búsqueda en bases de datos (e.g. MS-BLAST) para buscar bases de datos de proteínas que contengan la secuencia aminoacídica de proteínas conocidas. Al buscar en la base de datos, el algoritmo rompe todas las proteínas conocidas en una serie de fragmentos peptídicos predichos (un proceso que se conoce como digestión virtual con tripsina), y calcula la masa de cada fragmento. Se comparan las masas de los fragmentos predichos con las de los fragmentos de la proteína procedente de MALDI. Tras buscar en las bases de datos, el programa de búsqueda produce una serie de coincidencias entre las proteínas de la base de datos y la prote-

[5] *Nota del traductor:* la aplicación del término proteoma no se restringe a estas definiciones, pudiéndose aplicar también al conjunto completo de proteínas presentes en un tejido y en un fluido, como por ejemplo el contenido proteico de un tejido neural o el presente en fluidos, como el suero sanguíneo, el fluido cerebrorraquídeo o el fluido cerebroespinal embrionario, entre otros.

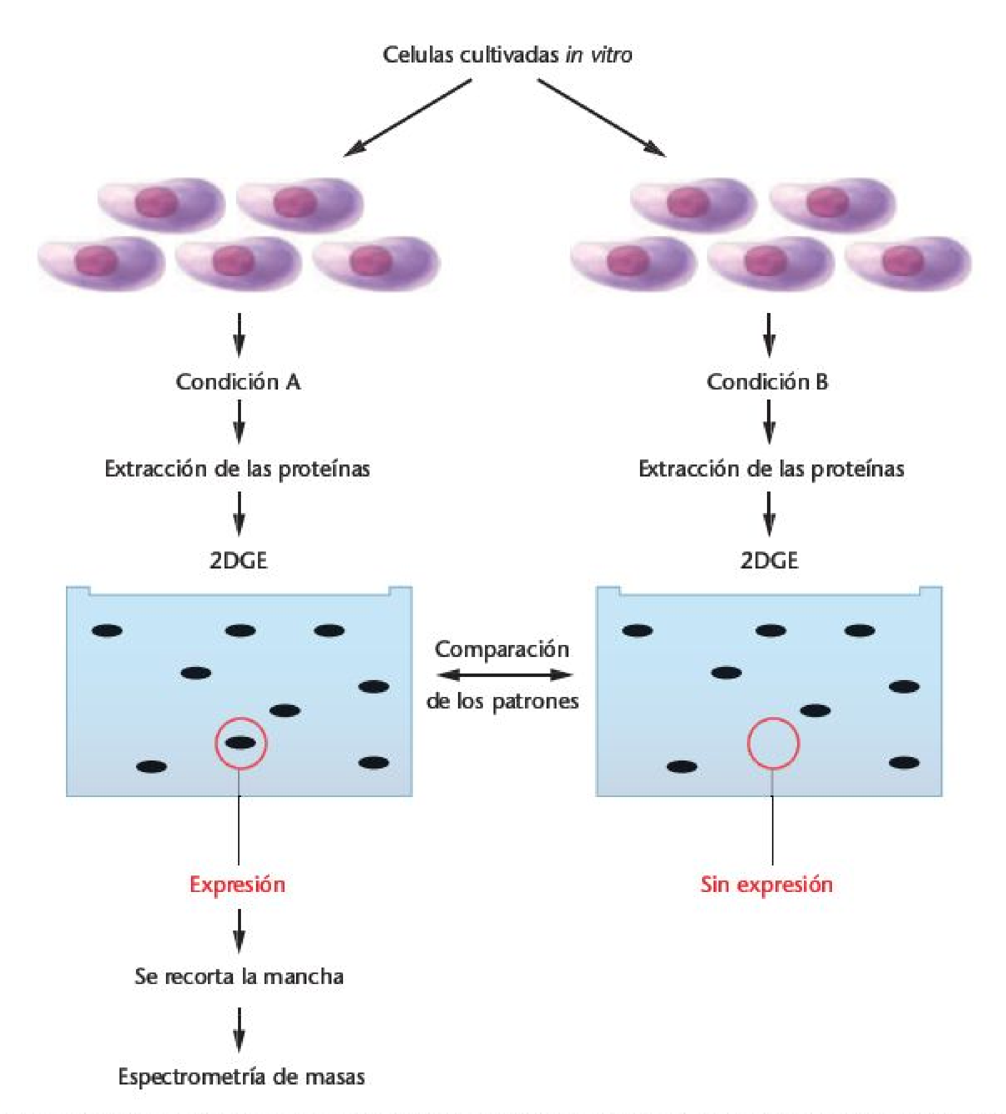


FIGURA 20.26 En un análisis proteómico típico, las células se exponen a dos condiciones diferentes (como condiciones de cultivo, medicamentos u hormonas). Tras el tratamiento, se extraen las proteínas y se separan mediante 2DGE. Entonces se compara el patrón de manchas y se buscan expresiones génicas diferenciales. Las manchas de interés se recortan del gel, se digieren en fragmentos peptídicos y se analizan mediante espectrometría de masas para identificar la proteína de la mancha.

ína a analizar. Las coincidencias se enumeran por orden de semejanza. Una coincidencia perfecta identifica una proteína sin ninguna ambigüedad. Sin embargo, debido a las modificaciones postranscripcionales y al procesamiento alternativo, puede que no haya una coincidencia perfecta, y que sea preciso confirmar la identidad de la proteína mediante otras técnicas de espectrometría de masas. Los instrumentos de alto rendimiento pueden identificar cientos de proteínas por día, y los bancos de espectrómetros pueden procesar miles de muestras en un solo día. Se están desarrollando nuevos instrumentos que procesan las muestras con más rapidez y con una mayor sensibilidad y precisión, lo que permitirá que la proteómica tenga un impacto importante en muchas áreas de la biología. En conjunto, estas técnicas y

Ahora resuelva esto

En el Problema 20.27 de la página 600 se usa un dominio proteico para buscar en una base de datos y recuperar proteínas con una secuencia determinada. Se le pide que explique por qué la función de la secuencia utilizada en la búsqueda no está relacionada con la función de las otras proteínas.

Sugerencia: Recuerde que los dominios proteicos pueden tener funciones relacionadas, y que las proteínas pueden contener diversos dominios diferentes.

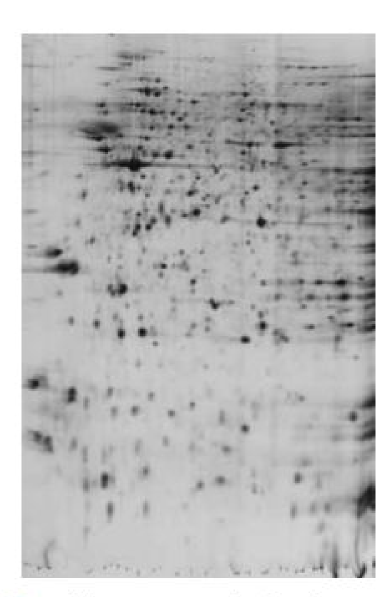


FIGURA 20.27 Gel de proteínas de dos dimensiones, que muestra las proteínas separadas en manchas. Estos geles pueden mostrar diversos millares de proteínas.

aproximaciones se conocen como **tecnología de análisis de alta cantidad de datos**.

El proteoma bacteriano cambia con las alteraciones ambientales

Como se destacó anteriormente, *M. genitalium*, cuyo genoma contiene 480 genes, representa uno de los organismos más simples de vida independiente conocidos. Valerie Wasinbger y sus colaboradores usaron proteómica para proporcionar una instantánea de los genes que se expresan en dos condiciones diferentes de cultivo de *M. genitalium*: el crecimiento exponencial y la fase estacionaria que sigue a un crecimiento rápido.



FIGURA 20.28 Las proteínas se digieren y se analizan mediante espectrometría de masas para identificar los productos génicos presentes en una célula en un momento dado.

Usando 2DGE, el grupo de Wasinger identificó 427 manchas proteicas en las células en crecimiento exponencial. De éstas, 201 fueron analizadas e identificadas mediante digestión de los péptidos, espectrometría de masas y comparación con proteínas conocidas. Este análisis descubrió 158 proteínas conocidas (el 33 por ciento del proteoma) y 17 proteínas desconocidas. Las manchas restantes incluían fragmentos procedentes de proteínas más grandes, formas diferentes de una misma proteína (isoformas), y productos modificados postraduccionalmente. Las proteínas identificadas incluían enzimas implicadas en el metabolismo energético, replicación del DNA, transcripción, traducción y transporte de materiales a través de la membrana celular.

Durante la transición desde el crecimiento exponencial hasta la fase estacionaria, hubo un 42 por ciento de reducción en el número de proteínas sintetizadas. Además, aparecieron algunas proteínas nuevas, mientras otras experimentaron cambios dramáticos de cantidad. Aparentemente, estos cambios son consecuencia del agotamiento de los nutrientes, del incremento de la acidez del medio de cultivo y de otras adaptaciones a los cambios ambientales.

El análisis de Wasinger ayuda a establecer el número mínimo de genes que se requieren para mantener el estado de vida, y los cambios de expresión génica que acompañan la transición a la fase estacionaria.

Este estudio también destaca una de las limitaciones de la tecnología proteómica actual: el 2DGE sólo permite detectar las proteínas que se expresan en mayor abundancia. En este estudio, la mayor parte del proteoma no se expresaba o no fue detectado porque las proteínas se encontraban en cantidades muy pequeñas (demasiado pequeñas como para ser detectadas en un gel), o no se solubilizaron y recuperaron con los métodos de extracción utilizados en el estudio de Wasinger. A pesar de estas limitaciones, el análisis proteómico proporciona una amplia gama de informaciones que no se pueden obtener mediante la secuenciación del genoma.

Análisis proteómico de un orgánulo: el nucleolo

El análisis proteómico se enfrenta a diversos problemas inherentes porque el proteoma es un sistema muy cambiante. Las proteínas celulares presentan una vasta gama de concentraciones (de un factor superior a un millón), y se forman centenares de modificaciones postraduccionales y de procesamientos alternativos, muchos de los cuales pueden resultar difíciles de separar entre sí. Además, la cantidad de proteínas varía específicamente durante el ciclo celular, y hay que hacer frente a muchas interacciones proteína-proteína. Otro problema es técnico: por diversos motivos, algunos de los cua-

les ya se han mencionado, generalmente las proteínas mostradas mediante 2DGE sólo representan una fracción de las presentes en la célula.

Una manera de reducir este problema es aislar una porción del proteoma de la célula. Esta aproximación reduce la complejidad de la muestra y mejora la separación y el análisis cuantitativo de los fragmentos peptídicos generados. Una manera de hacerlo es aislando orgánulos y componentes celulares. El análisis subproteómico se ha usado para estudiar con éxito los proteomas de los poros nucleares, de las superficies celulares, del nucleolo y de otros componentes celulares.

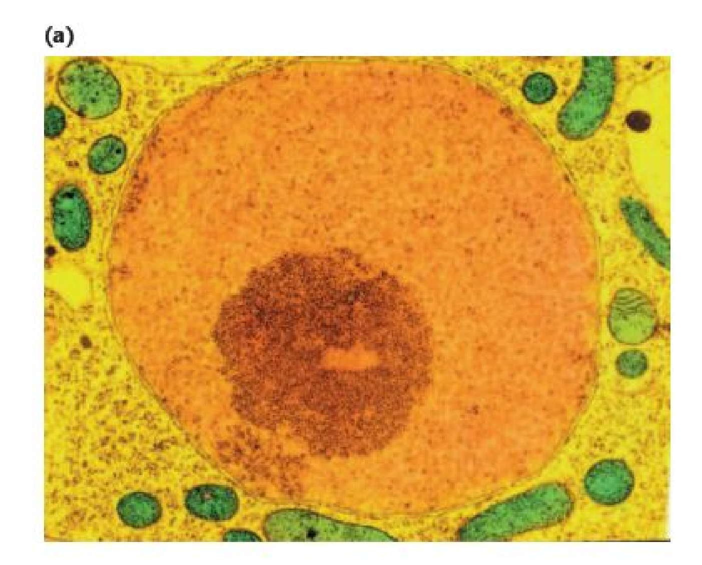
El **nucleolo** es generalmente el orgánulo más grande y prominente del núcleo eucariótico, y es una estructura dinámica. El nucleolo se forma al inicio de la fase G1 del ciclo celular en los sitios cromosómicos de los genes del rDNA [Figura 20.29(a)], y se desensambla justo antes de la mitosis. Se han descrito tres subcompartimientos distintos en el nucleolo: el centro fibrilar (FC), el compartimiento fibrilar denso (DFC), y el compartimiento granular (GC) [Figura 20.29(b)]. Tradicionalmente, el nucleolo se ha considerado sólo como el centro de procesamiento de los ribosomas, donde los RNA ribosómicos se transcriben en el FC, se procesan en el DFC y, junto con el RNA 5*S* y las proteínas ribosómicas, se ensamblan en las subunidades ribosómicas en el GC.

Para estudiar el proteoma nucleolar, Jens Andersen y sus colaboradores aislaron nucleolos de células HeLa humanas, una línea de células cancerosas, y analizaron la pureza de la muestra mediante diversos métodos, incluyendo microscopia electrónica [Figura 20.30(a)]. Las proteínas nucleolares se separaron mediante 2DGE. Para preparar las muestras para realizar MS se usaron diversos métodos, lo que permitió a los investigadores identificar más de 400 proteínas nucleolares [Figura 20.30(c)].

Este estudio identificó muchas proteínas que ya se sabía que estaban asociadas al nucleolo, así como también otras muchas proteínas nucleares que no se sabía que se encontraban en el nucleolo. Se confirmó la función del nucleolo en el ensamblaje de los complejos de corte y empalme (*spliceosomas*) y de otros complejos RNA-proteína. Más importante todavía, el descubrimiento de más de 100 proteínas previamente desconocidas, que constituyen el 32 por ciento del proteoma nucleolar, indica que la lista de funciones nucleolares probablemente crecerá todavía más cuando se caractericen estas proteínas y se les asigne una función.

Usando marcaje fluorescente de una de las proteínas nucleolares recién descubiertas (Proteína Paraspeckle 1, PSP1), el grupo de Andersen pudo demostrar que esta proteína se acumula en un compartimiento desconocido del nucleolo, denominado ***paraspeckles***, junto con al menos otras dos proteínas recién identificadas [Figura 20.30(b)]. Todas las células humanas examinadas hasta la fecha contienen de 10 a 20 *paraspeckles* en el espacio entre cromosomas, que están asociados a los componentes de corte y empalme de RNA. Los estudios muestran que PSP1 y las otras dos proteínas van y vienen del nucleolo al núcleo de manera dependiente de la transcripción. Cuando se inhibe la transcripción, estas tres proteínas van desde el núcleo hasta el nucleolo, y se localizan en una caperuza en la periferia del nucleolo [Figura 20.30(b)]. Este estudio enfatiza que todavía nos queda mucho por aprender sobre las interacciones dinámicas entre el núcleo y el nucleolo, y que el nucleolo es mucho más que una simple fábrica de ribosomas.

(a)



(b)

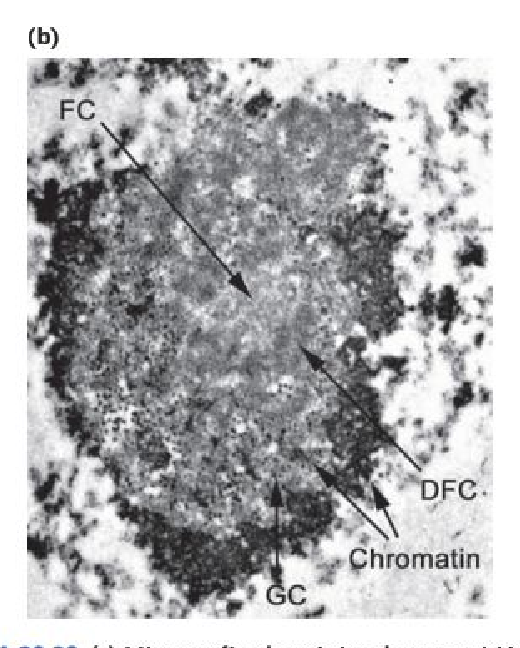


FIGURA 20.29 (a) Micrografía electrónica de transmisión que muestra el nucleolo en el núcleo de una célula eucariota. (b) Micrografía electrónica de transmisión del nucleolo que muestra los compartimentos nucleolares. Abreviaciones: FC: centro fibrilar; DFC: compartimiento fibrilar denso; y GC: compartimento granular.

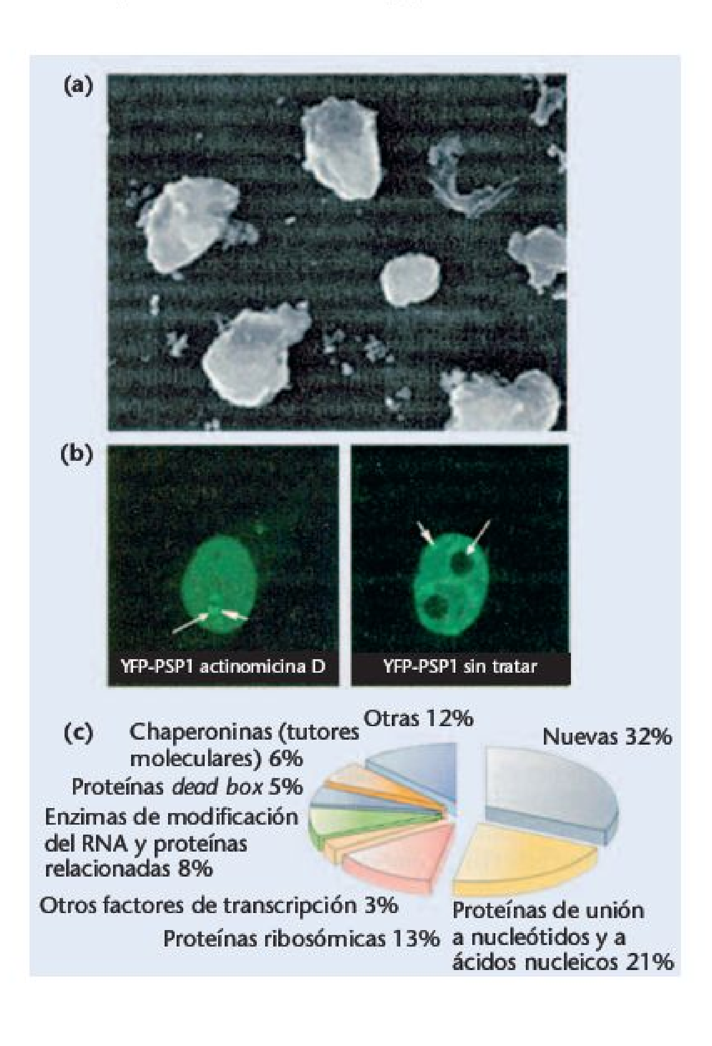


FIGURA 20.30 (a) Micrografía electrónica de rastreo que muestra nucleolos humanos purificados. Se solubilizaron las proteínas, se fraccionaron y se analizaron mediante espectrometría de masas. (b) A la derecha, localización de una proteína nucleolar recién identificada (PSP1), en unas estructuras nucleolares denominadas *paraspeckles*. A la izquierda, la inhibición de la transcripción por tratamiento con actinomicina D provoca la reorganización del nucleolo y la formación de estructuras en caperuza que contienen PSP1. (c) Asignación funcional de las más de 400 proteínas identificadas en este análisis proteómico. Las proteínas *dead box* son enzimas que participan en el plegamiento del RNA, incluyendo la formación de *spliceosomas* (complejos de corte y empalme). Observe el 32 por ciento de las proteínas identificadas eran desconocidas antes del análisis.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Más allá de Dolly: la clonación de seres humanos

El nacimiento de Dolly, una oveja saludable de cara blanca, sorprendió al mundo. Hasta febrero de 1997, la idea de que podría clonarse un animal a partir de células de otro animal adulto era de ciencia ficción, al estilo de *Un mundo feliz* o *Los niños del Brasil*. Para muchas personas, la noción que los animales podían clonarse les evocó escenas de muchos Adolf Hitler replicados, o de creaciones descarriadas, como el *Frankenstein* de Shelley. Durante décadas, el público se ha visto reconfortado por los científicos que aseguraban que sería imposible clonar un nuevo mamífero a partir de células de un adulto. Se pensaba que las células de animales adultos no podían ser reprogramadas de manera que pudiesen formar un nuevo organismo completo. Pero entonces apareció Dolly.

Dolly, el primer mamífero clonado de una célula adulta, fue generada por un grupo de embriólogos dirigidos por Ian Wilmut y Keith Campbell en el Roslin Institute, en Escocia. El motivo para desarrollar métodos para clonar animales de granja era proporcionar animales transgénicos idénticos que secreten productos farmacéuticos en su leche, como factores de coagulación sanguínea o insulina. De esta manera, los animales podrían usarse como biorreactores para sintetizar proteínas que son difíciles o caras de sintetizar en bacterias o en un tubo de ensayo.

El método de clonación que usaron Wilmut y Campbell para generar a Dolly, un procedimiento denominado *transferencia nuclear*, fue sugerido por primera vez en 1938 por el embriólogo Hans Spemann. La idea consiste sencillamente en reemplazar el núcleo de una célula huevo recién fecundada (o de un ovocito sin fecundar) por el núcleo de una célula adulta, generando así un zigoto «recons-

truido» que contiene el núcleo de un animal y el citoplasma del zigoto de otro. En teoría, la información genética del núcleo donante debería dirigir todo el desarrollo embrionario subsiguiente, y el nuevo organismo debería ser una réplica genética del adulto que donó el núcleo. Aunque en teoría este procedimiento parece sencillo, es extremadamente difícil en la práctica. Incluso si los procedimientos técnicos como la obtención de ovocitos, la eliminación de su núcleo y el transplante del núcleo donador fuesen perfectos, la clonación sólo funcionaría si el núcleo donador proviniese de un embrión. Puesto que los núcleos adultos provienen de estructuras especializadas como la piel, el hígado y el riñón, están «diferenciados» y solo expresan un pequeño grupo de genes del genoma nuclear. Como en un embrión todos los genes deben poderse expresar activamente, los núcleos adultos has demostrado no ser apropiados para este trabajo.

Wilmut y Campbell lograron lo que se percibía como imposible, reprogramando genéticamente el núcleo adulto antes de transferirlo al ovocito receptor. Obtuvieron células donadoras de una ubre de una oveja adulta y las mantuvieron en ayunas hasta que se convirtieron en quiescentes y entraron en la fase G0 del ciclo celular. Por motivos desconocidos, este procedimiento de ayuno permitió que los genes silenciosos del núcleo de la célula de ubre se activaran después de transplantar el núcleo al citoplasma de un ovocito de oveja. Además, los investigadores hicieron pasar una descarga eléctrica a través del ovocito para facilitar la transferencia nuclear y estimular al nuevo «zigoto» para que empezase a dividirse. Para generar a Dolly, se transfirieron más de 200 núcleos de células de ubre. De éstos, sólo 29 se desarrollaron en embriones, y 13 fueron implantados a ovejas adoptivas. Una quedó embarazada, lo que culminó en el nacimiento de Dolly.

Aunque Dolly fue el primer mamífero en ser clonado a partir de células adultas, desde entonces se ha utilizado esta aproximación para generar ratones clonados a partir de células adultas de ratón. Además, también se han clonado ovejas y vacas transgénicas usando procedimientos parecidos, con la excepción de que se usaron núcleos de células fetales como donantes, en vez de núcleos adultos. Una de estas ovejas transgénicas («Polly») lleva el gen humano del factor de coagulación sanguínea IX, y secreta este factor IX en su leche, preparando el terreno para la producción de productos farmacéuticos en animales de granja clonados.

Aparte de los beneficios para la producción de medicamentos, la clonación promete otras ventajas. Por ejemplo, la clonación podría permitir a los científicos conservar y reproducir especies en peligro de extinción, curar enfermedades genéticas en animales de granja y proporcionar modelos animales de enfermedades humanas para los que todavía no hay ningún modelo de investigación.

A pesar de las obvias ventajas para la agricultura y la medicina, la clonación de mamíferos ha generado protestas y preocupaciones. Se ha dicho que la idea de poder clonar humanos es inmoral, repugnante y éticamente equivocada. Cuando se anunció el nacimiento de Dolly, en el Congreso de los EEUU se introdujeron proyectos de ley para prohibir las investigaciones de clonación humana, y se exigieron prohibiciones a nivel mundial. Se propusieron escenarios de pesadilla: personas ricas y poderosas clonándose por cuestión de vanidad; personas con enfermedades graves clonando réplicas que les sirviesen de donantes de órganos; y legiones de clones humanos sufriendo pérdida de autonomía, de individualidad y atados a sus parientes. Pero, ¿es realmente posible clonar humanos? Y si lo fuese, ¿deberían clonarse seres humanos?

La respuesta a la primera pregunta es sencilla: para clonar a un humano se puede usar la misma tecnología utilizada para generar a Dolly. La mayoría de los procedimientos técnicos necesarios se están utilizando actualmente para la fecundación *in vitro*. Y parece probable que los núcleos humanos adultos puedan reprogramarse de manera parecida a los núcleos de ovejas adultas que generaron a Dolly.

La respuesta a la segunda pregunta no es tan simple. Hay tanto cuestiones científicas como éticas que nublan nuestro criterio sobre la clonación humana. La tecnología actual no puede garantizar el estado de salud de un individuo clonado, tanto si es un animal como una persona. Es posible que los clones presenten un mayor riesgo de padecer enfermedades genéticas o cáncer, debido a la acumulación de mutaciones en el núcleo adulto donador. Los clones también podrían presentar un envejecimiento prematuro, debido a la presencia de telómeros más cortos en los cromosomas donadores. Si el núcleo donador no está completamente reprogramado antes de la clonación, el clon pude sufrir también un desarrollo anormal. Hasta que no se resuelvan estas cuestiones de seguridad, podría ser prudente suspender cualquier intento de clonar humanos.

Las cuestiones éticas son todavía más problemáticas. Es fácil prever aspectos positivos de la clonación humana. Las parejas infértiles o aquellas que padecen enfermedades genéticas en una rama de la familia podrían elegir clonar a uno de los miembros de la pareja para tener un hijo biológicamente relacionado. La clonación de una célula de una persona *in vitro* podría proporcionar una fuente de células o de tejidos para tratar diversas enfermedades graves. Por otro lado, también se pueden prever aspectos negativos. ¿La clonación alteraría gravemente el significado de ser un ser humano único? ¿Cuál sería el destino de los clones generados para el trasplante de órganos? ¿Podría usarse esta técnica de manera indebida por personas sin escrúpulos para objetivos sociales o políticos? Es importante para la sociedad que se consideren estas cuestiones ahora, para asegurar resultados responsables y beneficiosos de esta nueva tecnología.

Bibliografía

Cibelli, J.B., et al. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256–58.

Pennisi, E. 1998. After Dolly, a pharming frenzy. *Science* 279:646–48.

Robertson, J.A. 1998. Human cloning and the challenge of regulation. *N. Eng. J. Med.* 339:118–25.

Solter, D. 1998. Dolly as a clone—and no longer alone. *Nature* 394:315–16.

Wilmut, I. 1998. Cloning, for medicine. *Sci. Am.* (Dec.) 58–63.

Wilmut, I. et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–13.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Las secuencias genómicas se analizan en diversos pasos para asegurar que la secuencia es precisa, para identificar todos los genes que codifica y para clasificar los genes conocidos en categorías funcionales. Entonces se depositan en bases de datos consultables.
2. Los genomas bacterianos presentan una alta densidad génica, de un gen por cada kilobase de DNA de media. Típicamente, hasta el 90 por ciento de su genoma codifica genes. Muchos genes están organizados en unidades transcripcionales policistrónicas que no contienen intrones. Los Arquea son un dominio procariótico. De alguna manera, sus genes, sus proteínas y su metabolismo se parecen a los de los eucariotas.
3. Los genomas eucarióticos se organizan en dos o más cromosomas, cada uno formado por una molécula lineal de DNA de doble cadena. Su densidad génica es mucho menor que en bacterias. Típicamente los genes no se organizan en operones; en cambio, cada uno es una unidad transcripcional separada. Sin embargo, el nemátodo *C. elegans* tiene muchos genes organizados en operones. A menudo los genes eucarióticos están interrumpidos por intrones.
4. Los eucariotas pluricelulares complejos presentan varias diferencias respecto las levaduras, que son menos complejas. Los primeros tienen más genes y mucho más DNA. El resultado es que su densidad génica cae hasta 1 gen por cada 5 kb, e incluso hasta 1 gen por cada 10-20 kb o más. Una alta proporción de genes eucarióticos tiene intrones. El número de intrones por gen y el tamaño de los intrones incrementan desde levadura hasta *C. elegans* y humanos. Algunas plantas, como *Arabidopsis,* tienen una estructura y una organización génicas indistinguibles de las de los animales. Otras, como el maíz, tienen una organización diferente, con vastos bloques de elementos transponibles que separan islotes de genes.
5. En el genoma humano, se observan grandes diferencias de densidad génica entre los distintos cromosomas, con regiones ricas en genes alternándose con regiones pobres en genes. Los segmentos duplicados son una característica común de los cromosomas secuenciados hasta la fecha.
6. Muchos genes eucarióticos han experimentado duplicaciones seguidas de divergencias génicas, lo que ha conducido a familias multigénicas. Los grupos génicos de las globinas son un ejemplo de este fenómeno.
7. La proteómica se utiliza para estudiar la expresión de genes en células bacterianas bajo diferentes condiciones de cultivo, y proporciona ideas sobre los grupos de genes que se usan durante el crecimiento. Estas técnicas también se han utilizado para estudiar la arquitectura de elementos subcelulares, como el nucleolo.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. ¿Cómo se generan las duplicaciones génicas, y cómo contribuyen a la evolución del genoma?

Solución: La duplicaciones génicas pueden generarse por entrecruzamiento desigual y resbalones del DNA. Además, aberraciones cromosómicas como inversiones y translocaciones también pueden conducir a duplicaciones génicas. Es posible duplicar genes mediante transferencia horizontal, lo que implica a transposones, a plásmidos y a otros DNAs transferidos. La duplicación génica contribuye a la evolución proporcionando oportunidades mutacionales sin comprometer la funcionalidad del genoma. Las duplicaciones génicas permiten experimentos mutacionales y por consiguiente evolución.

2. La secuenciación reciente de regiones heterocromáticas (secuencias ricas en repeticiones que se concentran en las áreas centroméricas y teloméricas) del genoma de *Drosophila* indica que en sus 20,7 Mb hay 297 genes que codifican proteínas (Bergman, et al 2002. *genomebiology3 (12)® ge nomebiology.com/ 2002/3/12/RESEARCH/0086*). Dado que las 116,8 Mb de las regiones eurocromáticas de su genoma contienen13.379 genes que codifican proteínas, ¿qué conclusión general se hace evidente?

Solución: La densidad génica en las regiones eucromáticas del genoma de *Drosophila* es aproximadamente de un gen por cada 8.730 pares de bases, mientras que la densidad génica en las regiones heterocromáticas es de un gen por cada 69.696,9 bases (20,7 Mb/297). Claramente, es mucho menos probable que cualquier región dada de heterocromatina contenga un gen si se compara con una región equivalente de eucromatina.

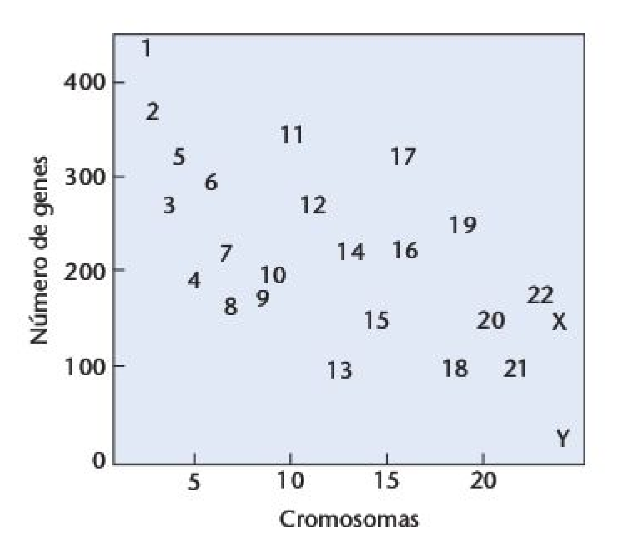
PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Los programas de predicción génica, que se usan en la anotación génica, permiten que los investigadores identifiquen probables regiones codificantes en las secuencias de DNA. La anotación es complicada cuando los genes son complejos, contienen múltiples sitios de iniciación o numerosos exones. Por ejemplo, Pavy y sus colaboradores (1999. *Bioinformatics* 15:887-99) determinaron que incluso para los organismos mejor estudiados, estos programas pueden predecir los límites correctos de los exones

sólo el 80 por ciento de las veces. Dado este porcentaje, ¿cuál es la probabilidad de determinar el límite correcto de los exones en un gen con cinco exones?

2. Esfuerzos recientes de secuenciación del genoma han proporcionado considerables ideas sobre la naturaleza molecular de los seres vivos. Sin embargo, cada vez se ha hecho más evidente que para comprender el genoma completamente, se necesitarán reanotaciones, verificaciones manuales y técnicas más avanzadas. Hass y sus colaboradores (2002. *genomebiology3(6)@genomebiology.com/2002/3/6/RESEARCH/0029*) han reanotado recientemente el genoma de Arabidopsis, y han encontrado 240 nuevos genes, 92 de los cuales son homólogos a proteínas conocidas. Además, han identificado una nueva clase de exones, denominados microexones, cuya longitud varía de 3 a 25 pares de bases. Basándose en esta información, ¿cómo matizaría la afirmación de que «conocer la secuencia del DNA es conocer el plano de la vida»?

3. En una anotación reciente y en una visión de conjunto del genoma humano, Wright y sus colaboradores (2001. *genomebiology2(7)@genomebiology.com/2001/2/7/RESEARCH/0025*) presentaron una gráfica parecida a la que se muestra a continuación. Esta gráfica proporciona el número aproximado de genes embrionarios específicos para cada cromosoma. Repase la información del texto sobre aneuploidías cromosómicas humanas y relacione esta información con la de la gráfica. ¿Proporciona esta gráfica ideas de por qué ocurren algunas aneuploidías mientras otras no?



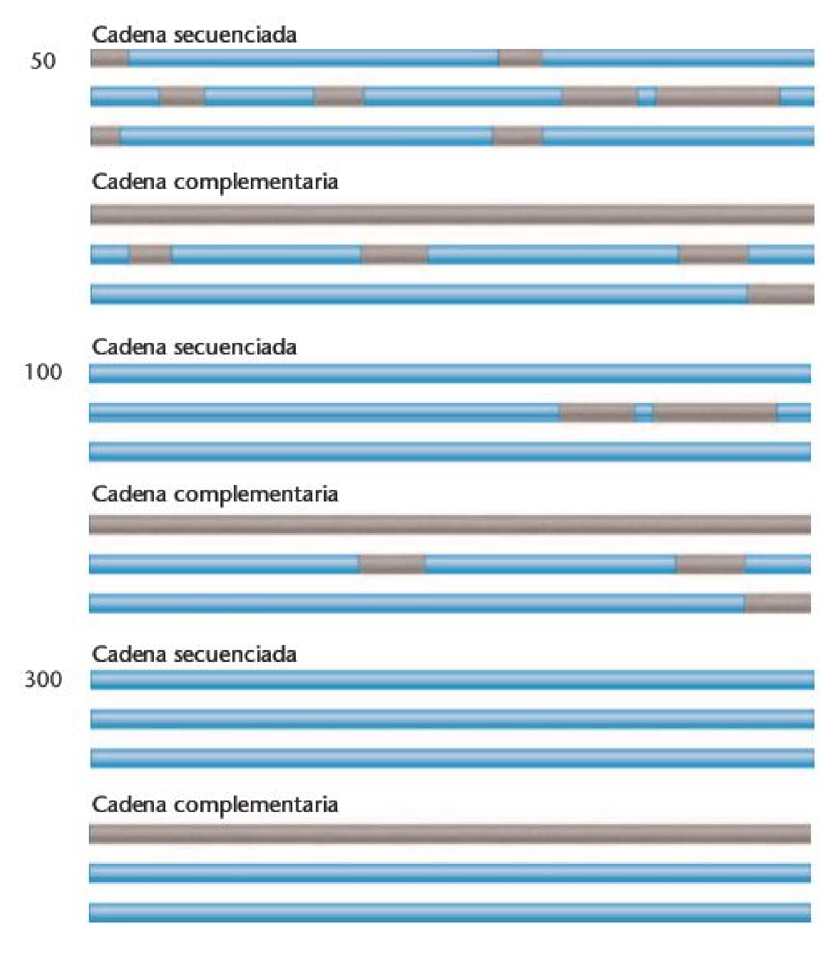
4. El proceso de anotación de un genoma secuenciado es continuo. En marzo del 2000 se hizo pública (se liberó) la primera secuencia anotada del genoma de *Drosophila,* que predecía 13.601 genes codificantes de proteínas en la región eucromática de su genoma. A continuación se muestran datos seleccionados de las Liberaciones 2 y 3. (Modificado de Misra et al. 2002. *genomebiology3(12)@genomebiology.com/2002/-3/12/RESEARCH/0083*). (a) Suponiendo una distribución uniforma para la Liberación 3, ¿cuántos pares de bases de DNA hay aproximadamente en *Drosophila* entre genes codificantes de proteínas? (b) En promedio, ¿cuántos exones hay aproximadamente por cada gen en la Liberación 3? (c) ¿Cuántos intrones hay aproximadamente por cada gen? (d) ¿Cuál parece ser la diferencia más importante entre las Liberaciones 2 y 3?

Criterio	Liberación 2	Liberación 3
Longitud total de la eucromatina	116,2 Mb	116,8 Mb
Genes totales codificantes de proteínas	13.474	13.379
Exones codificantes de proteínas	50.667	54.934
Intrones	48.381	48.257
Genes con transcritos alternativos	689	2729

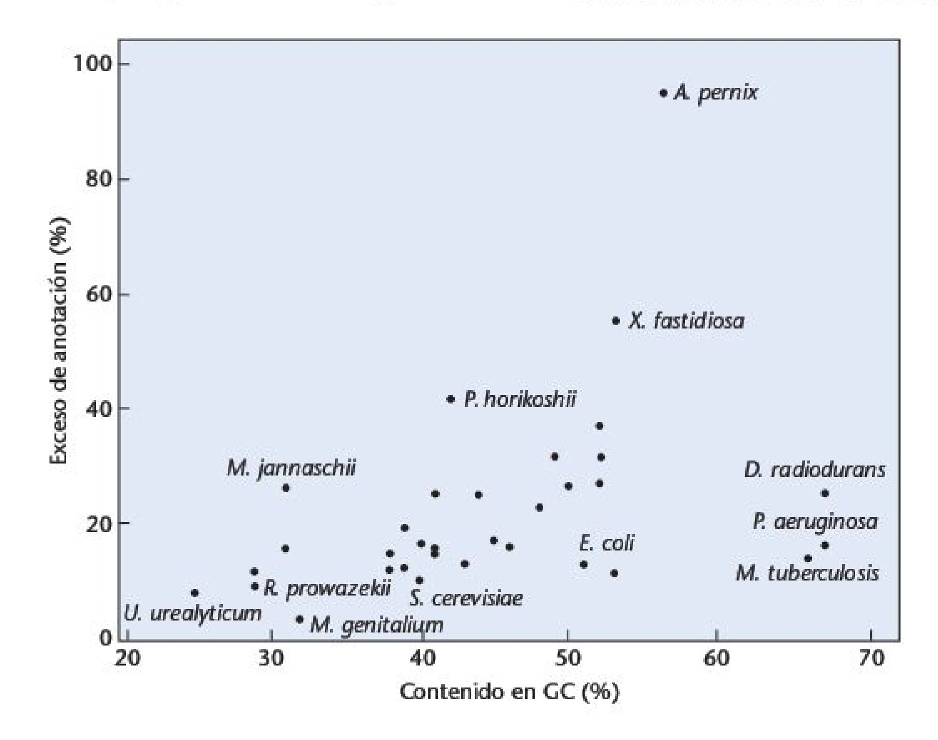
5. Los datos proporcionados en el Problema 4 indican que cuanto más detalladamente los investigadores examinan las secuencias genómicas, más complejas serán las interpretaciones de esos datos. Misra y sus colaboradores (2002) encontraron que en *Drosophila* son frecuentes los genes que se encuentran dentro de otros genes y los genes solapados. Determinaron que aproximadamente el 7,5 por ciento de todos los genes de la Liberación 3 estaban incluidos dentro de intrones de otros genes, y que la mayoría de ellos se transcribían a partir de la cadena complementaria a la usada para transcribir los genes que los incluían. Además, encontraron que aproximadamente el 15 por ciento de los genes anotados implicaban el solapamiento de los mRNAs en las cadenas complementarias. ¿Qué impacto tendrá esta información en la anotación genómica, y que importancia clínica puede tener?

6. En abril de 2003, los científicos anunciaron que el Proyecto Genoma Humano había terminado su misión y que ya se conocía todo el genoma humano. Se dice que uno de los líderes del proyecto dijo: «Tenemos delante nuestro el conjunto de instrucciones que nos llevan del cigoto a la tumba a través de la vida adulta». Sin embargo, desde su inicio, el HGP excluyó las regiones heterocromáticas de los extremos de los cromosomas y las regiones que rodean los centrómeros. El genoma humano tiene unas 3.000 Mb, y las regiones heterocromáticas comprenden aproximadamente el 15 por ciento del total. Si la densidad génica de la heterocromatina humana es parecida a la de *Drosophila*, ¿cuántos genes quedan aún por descubrir en los humanos? ¿Se sentiría cómodo afirmando que ya se han identificado todos los genes humanos? Vea la pregunta 2 de la sección Ideas y soluciones.

7. Uno de los principales problemas de la anotación es decidir cuán largo debe ser un ORF antes de ser aceptado como un gen. A continuación (página siguiente) se muestran tres rastreos diferentes de ORFs de la región genómica de *E. coli* que contiene el gen lacY. Las regiones sombreadas en marrón indican los ORFs. Los rastreos se han preparado para aceptar ORFs de 50, 100 y 300 nucleótidos como genes. ¿Cuántos genes posibles se detectan en cada rastreo? El ORF más largo cubre 1.254 pb; el siguiente 234 pb; y el más corto 54 pb. ¿Cómo puede decidir cuántos genes hay realmente en esta región? En este tipo de rastreo de ORFs, ¿qué es más probable, que se sobreestime o que se subestime el número de genes? ¿Por qué?



8. Para afrontar los problemas de anotar correctamente los genomas microbianos, Marie Skovgaard y sus colaboradores (2001. *Trends Genet.* 17:425-28) compararon el número de genes anotados en genomas a partir del análisis de secuencias con el número de proteínas conocidas en cada organismo presentes en las bases de datos proteicas. Los resultados de su estudio se resu-



men en la siguiente gráfica. Los errores varían desde un porcentaje muy bajo en *M. genitalium* hasta casi el 100 por ciento en *A. pernix*. La tendencia general que muestra esta gráfica es que la tasa de error incrementa al aumentar el contenido de GC del genoma. ¿Qué explicación podría justificarlo? ¿Qué precauciones se deberían tomar al anotar genomas con un alto contenido en GC?

9. ¿Qué son las islas CpG, y cómo se usan en el análisis de los genomas?

10. ¿Qué es la genómica funcional? ¿En qué se diferencia de la genómica comparativa?

11. ¿Qué características comparten los genomas de las Arqueas y los genomas eucarióticos?

12. ¿Cuán es la definición de operón? ¿Cómo la información del genoma de *Aquifex aeolicus* altera nuestras ideas sobre los operones? ¿Cómo encaja el hallazgo de las unidades transcripcionales del genoma de C. elegans en la definición clásica de operón?

13. Los plásmidos pueden transferirse entre especies bacterianas, y la mayoría transportan genes no esenciales. Por éstos y por otros motivos, los genes plasmídicos no se han incluido como parte de los genomas de las especies bacterianas. La bacteria *B. burgdorferi* contiene 17 plásmidos que contienen 430 genes, algunos de los cuales son esenciales para la vida. Los plásmidos que contienen genes esenciales, ¿deberían considerarse como parte del genoma del organismo? ¿Y los plásmidos que no contienen genes esenciales? En otras palabras, ¿cómo definimos el genoma del organismo en estos casos?

14. Compare y contraste la naturaleza química, el tamaño y la forma asumida por el material genético de las eubacterias y de levadura. Haga lo mismo con las arqueas y levadura. ¿Qué grupo tiene más diferencias y qué grupo más semejanzas con respecto a levadura?

15. ¿Por qué podríamos predecir que la organización del material genético eucariótico es más complejo que el de las bacterias y los virus?

16. Compare la organización de los genes bacterianos con la de los genes eucarióticos. ¿Cuáles son las diferencias principales?

17. *C. elegans* es un organismo eucariótico con un genoma de 97 Mb y unos 20.000 genes. ¿Qué características de organización de este genoma son poco corrientes cuando se compara con el de otros eucariotas, como levadura o *Drosophila*?

18. Basándose en la terminación de la secuencia del genoma de *Arabidopsis* el año 2000, Simillion y sus colaboradores (2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 99:13627-32) han estimado que en los últimos 100 millones de años el genoma de *Arabidopsis* ha experimentado tres ciclos de duplicación genómica o sucesos de poliploidización. Actualmente, de los aproximadamente 25.000 genes de Arabidopsis, estos investigadores estiman que aproximadamente el 80 por ciento se encuentran en regiones duplicadas del genoma. El examen de la Tabla 20.6 revela que *Arabidopsis*, arroz, maíz, y cebada tienen aproximadamente el mismo número de genes, pero que *Arabidopsis* tiene mucho menos DNA. ¿Qué tipo de organización genética parece justificar las vastas diferencias en el contenido de DNA con un número parecido de genes en estas especies?

19. La anotación de la secuencia del genoma humano revela que nuestro genoma contiene 25.000-30.000 genes. El análisis proteómico indica que las células humanas pueden sintetizar más de 300.000 proteínas diferentes. ¿Cómo se puede reconciliar esta discrepancia?

20. Enumere algunas de las siguientes características generales del genoma humano: tamaño, cuántas proteínas codifica, qué cantidad está formada de secuencias repetitivas, dónde se distribuyen los genes en los cromosomas y cuántos genes contiene.

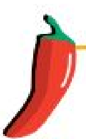
21. El descubrimiento de que *M. genitalium* tiene un genoma de 0,58 Mb y sólo 470 genes codificantes de proteínas ha encendido el interés para determinar el número mínimo de genes necesarios para una célula viva. Al buscar organismos con genomas cada vez más pequeños, se descubrió una especie de Arquea, *Nanoarcheum equitans*, en un afloramiento de alta temperatura en el suelo oceánico (Hubert et al. 2002. *Nature* 417:63-67). El tamaño celular de este procariota es de los más pequeños jamás descubiertos, y su genoma sólo tiene 0, 58 Mb. Sin embargo, organismos como *M. genitalium*, *N. equitans* y otros microbios con genomas muy pequeños son parásitos o simbiontes. ¿Cómo afecta esto a la búsqueda del genoma mínimo? ¿Debería redefinirse la definición del tamaño mínimo del genoma para una célula viva?

22. En la búsqueda del genoma bacteriano más pequeño y del número mínimo de genes necesarios para la vida, la atención se ha centrado en las especies de *Buchnera*, que viven como simbiontes intracelulares en las células intestinales de los áfidos. Como simbiontes, no necesitan mantener los genes necesarios para infectar al huésped ni para escapar de su sistema inmunitario, como deben hacer los parásitos o patógenos, por lo que sus genomas pueden ser más pequeños. Se ha secuenciado el genoma de una especie de *Buchnera* denominada APS. Tiene 564 genes en un cromosoma circular de 640 kb (Shigenobou et al. 2000. *Nature* 407:81-86). Para determinar si el tamaño del genoma de *Buchnera* se conserva entre diferentes grupos de áfidos, Gil y sus colaboradores (2000. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [USA] 99:4454-58) cartografiaron físicamente el tamaño del genoma de nueve genomas de *Buchnera* aislados de cinco familias de áfidos. Los genomas se midieron por digestión con enzimas de restricción y mediante la separación de los fragmentos resultantes por electroforesis en gel. En la siguiente tabla se proporcionan datos de algunas especies de Buchnera. Aunque hay alguna dis-

Tamaño de los fragmentos de DNA producidos por los enzimas de restricción (kb)

Buchnera	*Apa*I	*Rsr*II	*Apa*I + *Rsr*II	Longitud total del DNA en kb
APS	286, 226, 73, 52, 3.4	277, 264, 99	240, 104, 99, 73, 52, 45, 24, 3.4	640±
THS	545	545	320, 234	544±
CCE	440	450	405, 46	448±
CCU	265, 135, 50, 25	475	200, 136, 64, 50, 30	476±

crepancia respecto a su tamaño, la suma de los fragmentos se corresponde con el tamaño del cromosoma sin digerir que aparece en el gel. A partir del análisis de estos datos, ¿todavía se está produciendo una reducción del genoma de *Buchnera*? ¿Qué comparación se puede hacer entre los tamaños obtenidos de estos genomas y el de *M. genitalium*? La especie APS de *Buchnera* contiene 564 genes codificantes en un genoma de 641 kb. ¿Cuántos genes debe haber en la especie CEE? ¿Qué comparación se puede hacer con el número de genes de *M. genitalium*? ¿Hay otras maneras para determinar el mínimo genoma necesario para la vida sin buscar otras especies bacterianas con genomas pequeños?



Problemas extra-picantes

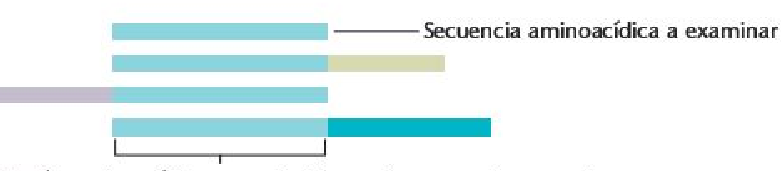
23. Además de las comparaciones de las secuencias nucleotídicas para determinar las relaciones filogenéticas entre los organismos, el estudio del orden de los genes se ha convertido en una fuente informativa para los estudios genómicos. Además de proporcionar pruebas de las relaciones evolutivas, los datos del orden génico se han usado para predecir la función génica y las interacciones funcionales de las proteínas. Tamades (2001. *Genome Biology 2: RESEARCH0020.* E pub 2001 Jun 01) determinó que en los procariotas, la pérdida del orden génico ocurre al incrementar la distancia filogenética, pero contrariamente a lo que se esperaba, se mantiene una conservación significativa en grupos distantes. ¿Qué factores podría esperar que contribuyesen a la conservación del orden génico entre especies distantes?

24. La secuenciación genómica ha abierto la puerta a numerosos estudios que ayudan a entender las fuerzas evolutivas que modelan la constitución genética de los organismos. Utilizando bases de datos con la secuencia de 25 genomas, Kreil y Ouzounis (2001. *Nucl. Acid. Res.* 29:1608-15) examinaron la relación entre el contenido en GC y la composición aminoacídica global. Encontraron que es posible identificar las especies termófilas sólo sobre la base de su composición aminoacídica, lo que sugiere que la evolución en ambientes calientes selecciona una determina composición aminoacídica para el organismo. ¿De qué manera podría influir la evolución en ambientes extremos en la composición genómica y aminoacídica? ¿Cómo podría influir la evolución en ambientes extremos en la interpretación de los datos de secuencias genómicas?

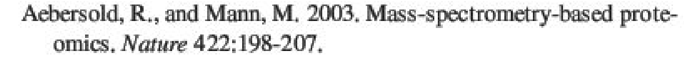
25. ¿Qué son los pseudogenes, y cómo se generan?

26. La familia génica de la β-globina se encuentra en 60 kb de DNA, a pesar de qué sólo el 5 por ciento de este DNA codifica productos génicos. Justifique tanto como pueda el 95 por ciento de DNA restante.

27. La anotación del proteoma intenta correlacionar cada proteína con su función en el tiempo y en el espacio. Tradicionalmente, la anotación proteica depende de la comparación de la secuencia aminoacídica entre la proteína que se examina y una proteína de función conocida. Si dos proteínas compartiesen una porción considerable de su secuencia, a la proteína que se examina se le asignaría la función de la proteína anotada. A continuación se muestra una representación del método de anotación proteica «parecen iguales» que implica la secuencia que se examina y tres proteínas humanas diferentes (modificado de Rigoutsos, et al. 2002. *Nucl. Acid. Res.* 30:3901-16). Observe que la secuencia a examinar se alinea con los dominios comunes de las otras proteínas. ¿Qué argumento podría presentar para sugerir que la función de la proteína examinada no está relacionada con la función de las otras tres proteínas?



Lecturas seleccionadas



Aebersold, R., and Mann, M. 2003. Mass-spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198-207.

Andersen, J. et al. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12:1-11.

Brett, D., et al. 2002. Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics* 30:29-30.

Harrison, P.M., et al. 2002. A question of size: the eukaryotic proteome and the problem in defining it. *Nucl. Acids Res.* 30:1083-90.

International Chimpanzee Chromosome 22 Consortium. 2004. DNA sequence and comparative analysis of chimpanzee chromosome 22. *Nature* 429:383–88.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Kiyosawa, H., et al. 2004. Systematic genome-wide approach to positional candidate cloning for identification of novel human disease genes. *Internal Med. J.* 34:79-90.

Nobrega, M.A., and Pennachio, L.A. 2003. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *J. Physiol.* 554:31-39.

Schriml, L.M., et al. 2003. Human disease genes and their cloned mouse orthologs: exploration of the FANTOM2 cDNA sequence data set. *Genome Res.* 13:1496-1500.

Switnoski, M., Szczerbal, I., and Nowacka, J. 2004. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *J. Appl. Physiol.* 45:195-214.

Tyers, M., and Mann, M. 2003. From genomics to proteomics. *Nature* 422:193-97.

Venter, J.C., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-51.

Disección de la función génica: análisis mutacional en organismos modelo



Ratón que lleva una mutación en el gen de la distrofina y que se usa de modelo para la investigación de la distrofia muscular humana. Este ratón ha sido tratado con terapia génica, introduciendo una copia normal del gen en sus células musculares.

Conceptos del capítulo

- Los genéticos exploran las relaciones entre el genotipo y el fenotipo usando una amplia variedad de herramientas experimentales. La mutación génica es la herramienta experimental más potente.
- Un buen modelo para análisis genético debe ser fácil de cultivar o estabular, tener un periodo de generación corto, poseer un genoma pequeño, producir una progenie abundante y ser fácil de mutagenizar y de aparear
- El análisis genético directo empieza con el aislamiento de mutantes, a lo que sigue la definición de las rutas genéticas, la clonación del gen y la generación de más mutantes para identificar las interacciones genéticas.
- El análisis genético reverso empieza con un gen clonado silvestre o con una proteína purificada y progresa hacia la mutagénesis específica de sitio y el análisis fenotípico, el orden contrario al seguido en el análisis genético hacia delante.
- La genómica funcional y las tecnologías de análisis de alta cantidad de datos permiten a los genéticos diseccionar las interacciones de miles de productos génicos simultáneamente, apoyando las nuevas ciencias de la genómica, la proteómica y la transcriptómica.

Uno de los principales objetivos de la genética es entender qué son los genes y cómo funcionan. Puesto que los genes controlan todos los aspectos de la actividad biológica, una de las preguntas centrales en cualquier investigación biológica es conocer qué genes están implicados en cada proceso y cómo los productos de estos genes controlan el fenotipo e influencian la función. El análisis genético ha incrementado drásticamente nuestra comprensión de procesos biológicos tan simples como las reacciones bioquímicas en las células, y tan complejos como los estadios de desarrollo que conducen a la generación de un organismo pluricelular.

Pero, ¿cómo diseccionan los genéticos la función génica? ¿Cómo descubren qué genes están implicados en un proceso biológico y cómo estos genes controlan el fenotipo?

En el análisis genético clásico, los genéticos intentan responder a estas preguntas genéticas coleccionando diversos individuos que muestren mutaciones que afecten el fenotipo de interés. A partir de aquí, determinan si ese fenotipo viene controlado por un gen o por más de uno, qué genes son los responsables de cada paso en la ruta que conduce al fenotipo, y cómo cada producto génico controla el fenotipo a nivel bioquímico. Empezando con una colección de mutantes, los genéticos identifican, clonan y caracterizan la función de los genes.

La genómica moderna y la biología molecular han incrementado enormemente el número de herramientas disponibles para los análisis genéticos. Actualmente es posible empezar un análisis genético con un gen clonado cuya función se desconozca, generar una mutación específica en el gen clonado, y poner a prueba el fenotipo y la función de estos genes mutados en un organismo modelo, lo que se denomina «genética reversa». Además, las modernas herramientas de la genómica, como las microordenaciones de DNA, los secuenciadores automáticos y la bioinformática computerizada permiten a los genéticos explorar patrones totales de expresión génica que afecten fenotipos o procesos biológicos específicos.

En este capítulo se explorarán algunos organismos modelo y cómo estos organismos permiten a los genéticos responder a preguntas biológicas específicas. Se examinarás las técnicas de genética directa y reversa, y también los nuevos métodos moleculares de la genómica funcional, la transgénesis y los *knockouts* génicos (mutantes de pérdida de función).

21.1 Los genéticos usan organismos modelo que son genéticamente tratables

Para diseccionar los genes y los procesos que regulan las funciones biológicas, los genéticos realizan sus experimentos usando **organismos modelo**. No todos los organismos son candidatos ideales para el análisis genético. Por ejemplo, el objetivo de la investigación puede ser entender la genética del cáncer en humanos o el control genético del desarrollo en una planta importante para la agricultura. Sin embargo, los genéticos no pueden realizar mutagénesis de manera efectiva, ni apareamientos rápidos controlados, ni clonar genes en la mayor parte de seres vivos, complejos y de crecimiento lento, como nuestra propia especie. Además, los investigadores deben tener en cuenta consideraciones éticas cuando realizan experimentación genética en humanos y en otros muchos animales.

Un buen organismo modelo para análisis genético debe ser fácil de mantener en el laboratorio, tener un periodo de generación corto, producir una progenie abundante y ser fácil de mutagenizar y de aparear. Además, el organismo debe realizar el proceso biológico a estudiar. Sin embargo, uno se puede preguntar si el conocimiento conseguido sobre la función génica en organismos de laboratorio sencillos es relevante para entender la función génica en plantas superiores y en animales.

Por fortuna, la genética, la biología molecular y la secuenciación del genoma revelan que muchos de los genes y de los procesos moleculares que gobiernan las funciones biológicas están compartidos a través de la evolución. Muchas secuencias génicas están conservadas desde las levaduras hasta los vertebrados superiores, y a menudo estos genes desempeñan funciones similares en una amplia gama de organismos. Por ejemplo, los genes que regulan los puntos de control del ciclo celular en levadura tienen sus correspondientes homólogos en humanos. Las versiones humanas de estos genes regulan el ciclo celular y actúan de genes supresores de tumores. Aproximadamente 200 de los 300 genes de enfermedades humanas que se conocen en la actualidad presentan similitudes de secuencia con genes de la mosca del vinagre y de nematodo. Aproximadamente 100 de estos genes también son similares a genes de levadura. Más de la mitad de los genes conocidos relacionados con el cáncer en humanos tienen homólogos en *Drosophila*. Además, muchos procesos iniciales del desarrollo y los genes que los controlan están conservados en moscas, nematodos, ratones y humanos. Los genéticos aprovechan estas similitudes genéticas para estudiar los fundamentos del metabolismo, del desarrollo y de las enfermedades en organismos de laboratorio sencillos, y después aplican estos conocimientos a eucariotas más complejos.

Características de los organismos modelo en genética

Los organismos eucarióticos que se han utilizado más en investigación genética son *Saccharomyces cerevisiae* (una levadura que se reproduce por gemación) y *Shizosaccharomyces pombe* (una levadura que se reproduce por fisión), *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre o de la fruta), *Caenorhabditis elegans* (nematodo), *Arabidopsis thaliana* (planta de la mostaza) y *Mus musculus* (ratón). Cada uno de estos organismos modelo se beneficia de la gran cantidad de conocimiento genético que se ha almacenado durante décadas de investigación genética, incluyendo bases de datos con la secuencia completa de sus DNAs y colecciones de cepas que llevan deleciones y mutaciones específicas, lo que hace que el análisis genético sea

rápido y eficiente. Además, cada uno de estos organismos tiene características que lo convierten en el modelo de elección para estudios particulares. En este capítulo nos centraremos en las técnicas de disección genética en tres de estos organismos: levadura, *Drosophila* y ratón.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿De qué información experimental se dispone actualmente que haga que los organismos como levadura o *Drosophila* sean modelos adecuados en los que estudiar genes que afectan los procesos biológicos humanos?

Levadura como organismo modelo en genética

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, conocida también como levadura de panadería, es uno de los organismos modelo más populares para la investigación genética. Debido a la facilidad con que se pueden manipular y caracterizar los genes en este organismo, a menudo los genéticos hacen referencia «el alucinante poder de la genética de la levadura».

Las células de levadura pasan por fases haploides (1n) y diploides (2n) durante su ciclo celular (Figura 21.1). Durante estas fases, la división celular se produce mediante la formación de una yema, un proceso mitótico en el que sobre la superficie de la célula madre se forman células hijas genéticamente idénticas pero más pequeñas, que crecen y con el tiempo se separan de la madre (Figura 21.2). Las células haploides pertenecen a uno de los dos tipos posibles de apareamiento, a y α. Tanto las células a como las α se dividen por mitosis mediante la formación de yemas, hasta que una señal química conocida como feromona las estimula a aparearse. A la fusión de una célula con tipo de apareamiento a con una con tipo de apareamiento α le sigue la fusión de sus núcleos y la formación de una célula de levadura diploide. La célula diploide continúa formando yemas o bien experimenta meiosis y esporula, en función de la disponibilidad de nutrientes. El proceso de meiosis resulta en un barajamiento genético y en la formación de cuatro esporas haploides.

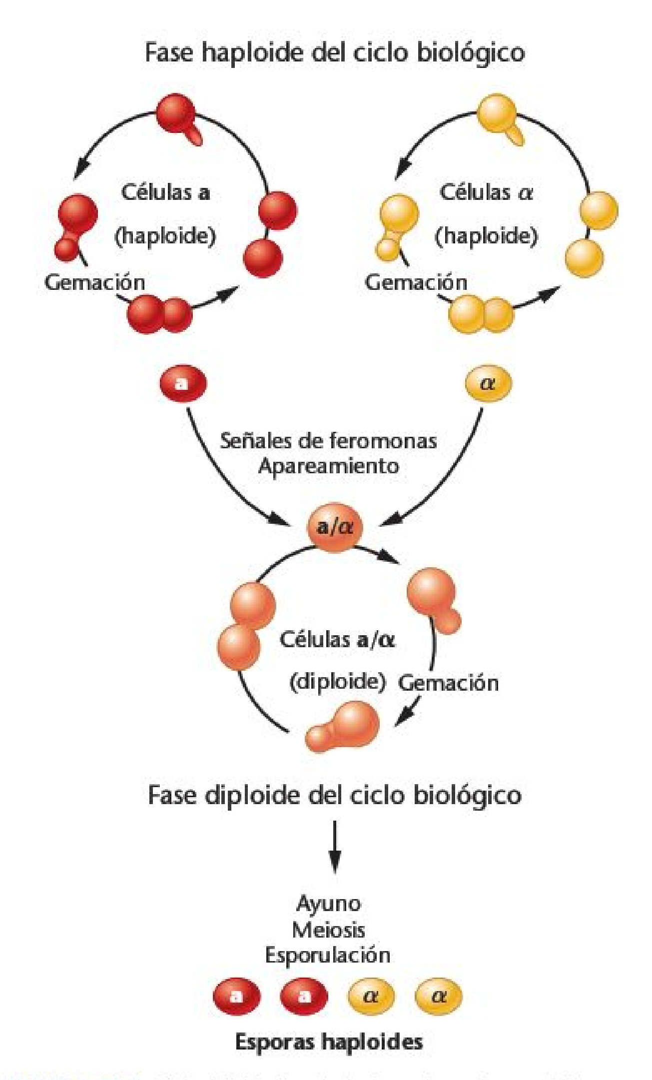


FIGURA 21.1 Ciclo biológico de la levadura *S. cerevisiae*, que se reproduce por gemación. Levadura puede crecer como células haploides y diploides. Tanto las células haploides como las diploides se dividen por gemación. Cuando las células haploides son estimuladas con feromonas se fusionan para formar diploides. En respuesta a un ayuno, las células diploides experimentan meiosis y esporulación, generando cuatro esporas haploides.

La naturaleza alternante haploide y diploide del ciclo celular de levadura es especialmente útil para los análisis genéticos. Es fácil detectar mutaciones recesivas en las células haploides, ya que el alelo recesivo no está enmascarado por el alelo silvestre. La fase diploide permite más estudios, como el análisis de complementación. Además, se pueden mantener las mutaciones letales recesivas en una cepa de levadura diploide que lleve la mutación en un cromosoma y el alelo silvestre en el otro cromosoma.

Otra de las ventajas más importantes de usar levadura como modelo genético es la disponibilidad de la información de la secuencia de su DNA y las colecciones de cepas mutantes y con deleciones. *S. cerevisiae* fue el primer eucariota que tuvo el genoma secuenciado, completándose su proyecto en 1996. El análisis bioinformático del genoma de levadura revela que contiene unos 6.000 genes. Aproximadamente 4.000 de estos genes tienen una función conocida o se ha anticipado su función en base a semejanzas de secuencia con otros genes conocidos. Los genéticos de levadura también disponen de una biblioteca de cepas de levadura que contienen deleciones en cada pauta de lectura abierta (ORF) de su genoma, los que permite el acceso inmediato a cepas con falta de función (cepas nulas) para cada gen de levadura.

Estas características, combinadas con la facilidad con que levadura se puede cultivar, mutagenizar, transformar con plásmidos y manipular genéticamente, han hecho de este orga-

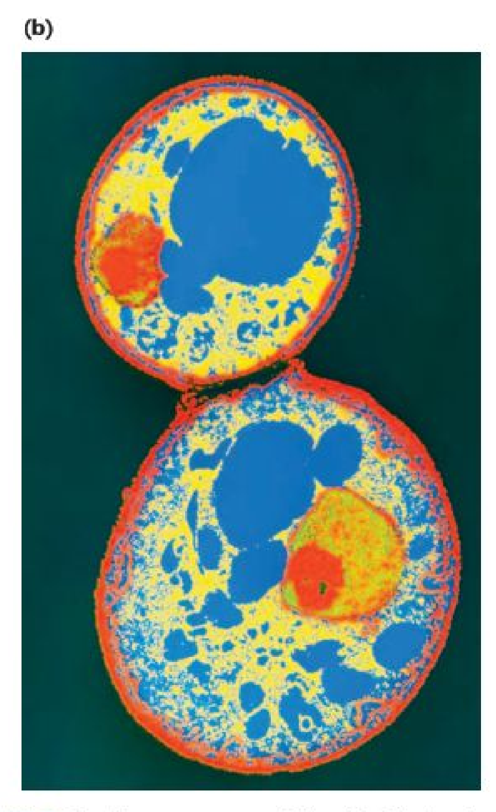


FIGURA 21.2 *Saccharomyces cerevisiae*. (a) Células de levadura en varios estadios del ciclo biológico. Las cicatrices de la superficie de las células indican los sitios de sucesos de gemación anteriores.
(b) Fotomicrografía de una célula de levadura en gemación. La pared celular se muestra en rojo, el citoplasma en azul/amarillo, y el núcleo en rojo/verde.

nismo un modelo popular para la disección genética. Las técnicas moleculares para delecionar genes o reemplazarlos por genes mutagenizados *in vitro* también confiere poder al análisis genético de levadura. La principal desventaja de levadura es no se pueden realizar estudios de comunicación pluricelular y de desarrollo. Estos tipos de estudios requieren la utilización de organismos modelo como *Drosophila*, *C. elegans*, *Arabidopsis* o ratón.

Drosophila como organismo modelo en genética

Como levadura, *Drosophila* es sensible al análisis genético en parte por la facilidad de cultivo y por el tamaño de su genoma, unos 13.000 genes distribuidos en cuatro cromosomas (Figura 21.3). *Drosophila* tiene un tiempo de generación corto, de unos 10 días desde el huevo fecundado hasta adulto. Cada hembra de mosca produce unos 3.000 descendientes durante su vida. En el Capítulo 23 se describen los estadios del ciclo biológico de *Drosophila* y algunos de los genes que controlan su desarrollo.

Quizás la mayor robustez de *Drosophila* para el análisis genético sea su diseño corporal en los estadios embrionario, larvario y adulto, muy fácil de observar. El exoesqueleto de mosca presenta a los científicos una gran abundancia de características, como el color de los ojos, la forma de las alas, las quetas y la organización de los segmentos, que se pueden identificar fácilmente usando un microscopio óptico. Los cambios en estas características reflejan mutaciones en los genes que controlan los procesos de diferenciación y de desarrollo.

Una característica importante de la genética de *Drosophila* es la ausencia de entrecruzamientos en machos, y las moderadas cantidades de entrecruzamiento en hembras. La ausencia de entrecruzamiento en machos significa que es posible retener las relaciones de ligamiento cromosómico de los genes que se heredan a través del progenitor masculino. Esta característica simplifica diversos aspectos del análisis genético, incluyendo la utilización de sofisticadas técnicas de **rastreo genético**, que se describen posteriormente.

A diferencia de levadura, *Drosophila* no tiene una fase haploide en su ciclo biológico. Por eso, los genéticos han ideado ingeniosas herramientas experimentales para examinar las mutaciones recesivas y para mantener reservas de organismos mutantes que llevan mutaciones letales recesivas. Una de las herramientas más importantes es el **cromosoma balanceador**. Los investigadores han generado estos cromosomas bombardeando *Drosophila* con rayos X, lo que ha conducido a numerosas inversiones cromosómicas solapadas. La presencia de múltiples inversiones evita que se recuperen productos de entrecruzamientos (como se describe en el Capítulo 8). En consecuencia, un cromosoma balanceador y su cromosoma homólogo normal permanecen como entidades intactas en la población sin que pase a la progenie ningún cromosoma recombinante. Los cromosomas balanceadores también contienen un gen marcador dominante, como un gen para el color de los ojos o la forma de las alas. Esto permite que los genéticos identifiquen visualmente la presencia del cromosoma balanceador en moscas individuales durante los apareamientos. Además, los cromosomas balanceadores contienen un gen letal recesivo, lo que evita que sobrevivan las moscas homocigotas *balancea-*

(a)



(b)



FIGURA 21.3 Cultivo y manipulación de cultivos de *Drosophila*. (a) Las moscas se alimentan y ponen los huevos en medio de agar vertido en botellas de leche. Las larvas se alimentan en el medio, y después se arrastran lentamente hacia arriba por las paredes de la botella para pupar. (b) Los genéticos observan las moscas anestesiadas bajo una lupa y clasifican las moscas en grupos usando un pequeño pincel.

dor/balanceador. Por lo tanto, los únicos descendientes que sobreviven a los apareamientos entre heterocigotos con mutaciones letales recesivas son los heterocigotos y los homocigotos silvestres. Existen cromosomas balanceadores para los tres cromosomas autosómicos y para el cromosoma X. En la siguiente sección se describe la utilización de un cromosoma balanceador para recuperar mutaciones letales recesivas ligadas a X. En el caso que se estudia al final de este capítulo, en la Sección 21.5, se describe un uso innovador de cromosomas balanceadores para recuperar, mantener y analizar mutaciones letales recesivas durante los rastreos de mutantes.

Los genéticos también explotan los elementos *P*, un tipo de transposones, como unas potentes herramientas genéticas en *Drosophila*. Como se describió en el Capítulo 15, los elementos *P* son elementos móviles transponibles que se pueden mover dentro y fuera del genoma de *Drosophila*. La transposición ocurre en presencia de la enzima transposasa del elemento *P* que reconoce y actúa sobre una repetición invertida de 31 pb que hay en cada extremo del DNA del elemento *P*. Los genéticos de *Drosophila* han utilizado elementos *P* como vectores para introducir genes clonados en el genoma de *Drosophila*. Primero insertan el gen clonado de interés en medio de un elemento P, que también contiene un gen para una característica visible como el color de los ojos. Después, inyectan el DNA del elemento P recombinante en huevos, junto con una plásmido ayudante que codifica el gen de la transposasa (Figura 21.4). El gen de la transposasa se transcribe y se traduce en las células germinales del embrión inicial, lo que permite que el elemento *P* recombinante que contiene el gen de interés se inserte en el DNA de la línea germinal del embrión. Puesto que el plásmido ayudante no puede integrarse en el genoma ni persistir durante el desarrollo, no se pueden producir nuevas transposiciones. La transformación mediada por elementos *P* es una de los métodos más eficientes para introducir genes clonados en eucariotas superiores.

Los genéticos de *Drosophila* también usan los elementos *P* como mutágenos y como herramientas para ayudar durante la clonación de genes. Para generar mutaciones por inserción de elementos *P*, se cruzan dos cepas de moscas. Una cepa contiene un elemento *P* que codifica la enzima transposasa pero carece de los extremos del elemento *P*, que son necesarios para su transposición. La otra cepa contiene un elemento *P* con los extremos intactos, y un gen que codifica un marcador visible como el color de los ojos. Este segundo elemento *P* también contiene un gen de resistencia a antibióticos, y secuencias ORI procedentes de DNA plasmídico bacteriano (Figura 21.5). Las células germinales de la progenie F_1 de un apareamiento entre estas dos cepas sintetizan la enzima transposasa y transportan el elemento *P* móvil. En estas células germinales de la F_1, el elemento *P* móvil se escindirá y se insertará aleatoriamente en el genoma. Algunas de estas inserciones se producirán dentro o alrededor de genes importantes, interfiriendo en su función. Entonces los investigadores rastrean en busca de fenotipos mutantes entre los descendientes de la F_2 que muestran el marcador visible (p.e. el color de ojos), ya que éstos son debidos a la inserción de elementos *P* en posiciones nuevas del genoma de *Drosophila*.

El siguiente paso es clonar el gen desconocido en el que se ha insertado el elemento *P*. Como se muestra en la Figura 21.5, los investigadores purifican DNA genómico de la nueva cepa mutante de moscas, lo digieren con una enzima de restricción que haga un corte dentro del elemento *P* y otros cortes en dis-

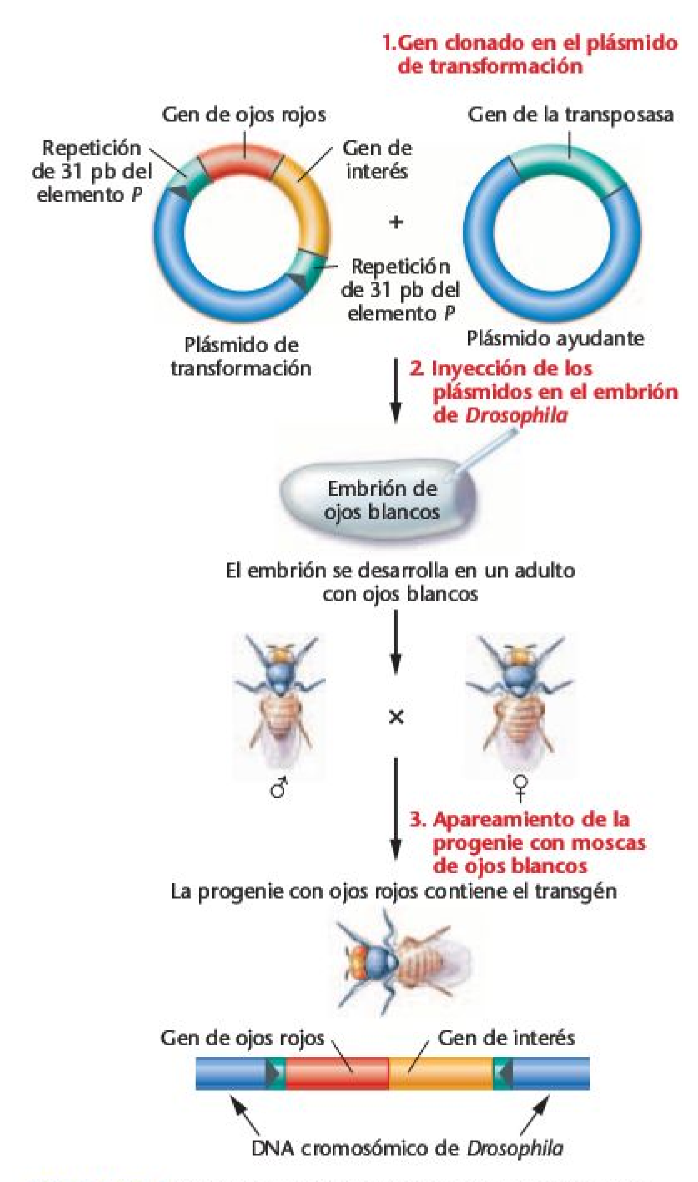


FIGURA 21.4 Transformación mediada por elementos P en *Drosophila*. Se clona el gen de interés en un plásmido de transformación, que también contiene un gen dominante para el color de los ojos (p.e. ojos rojos silvestres). Los genes están flanqueados por los extremos de un elemento P (repeticiones invertidas de 31 pb). El plásmido de transformación y el plásmido ayudante que contiene el gen de la transposasa se coinyectan en células huevo fecundadas de una hembra mutante recesiva homocigota de ojos blancos. Las secuencias del elemento P junto con los dos transgenes se insertan en el DNA de las células germinales del embrión. Si el plásmido de transformación se ha insertado en las células germinales del progenitor, la progenie de esta mosca expresará el marcador de color de ojos (rojo).

tintas posiciones fuera del elemento *P*, dentro o cerca del gen interferido. Esta digestión libera un fragmento de DNA que contiene parte del elemento P y parte del gen desconocido. Entonces, tratan el DNA digerido con DNA ligasa, que hace que los fragmentos de DNA digerido se cierren en círculos cerrados. Luego, las moléculas de DNA circulares cerradas resultantes se transforman en bacterias. Sólo las bacterias que hayan incorporado los círculos cerrados que contienen el gen de resistencia a antibiótico (junto con el gen desconocido unido) crecerán formando colonias en un medio que contenga este antibiótico.

Actualmente, el Proyecto Genoma de *Drosophila* de Berkeley ha coleccionado cepas de moscas que contienen inserciones de elementos *P* en aproximadamente el 25 por ciento de los 13.000 genes de *Drosophila*. El objetivo de este proyecto es generar mutaciones de pérdida de función (nulas) en todos los genes esenciales, produciendo así un «equipo de *knockout* (mutantes de pérdida de función) génicos».

El ratón como organismo modelo en genética

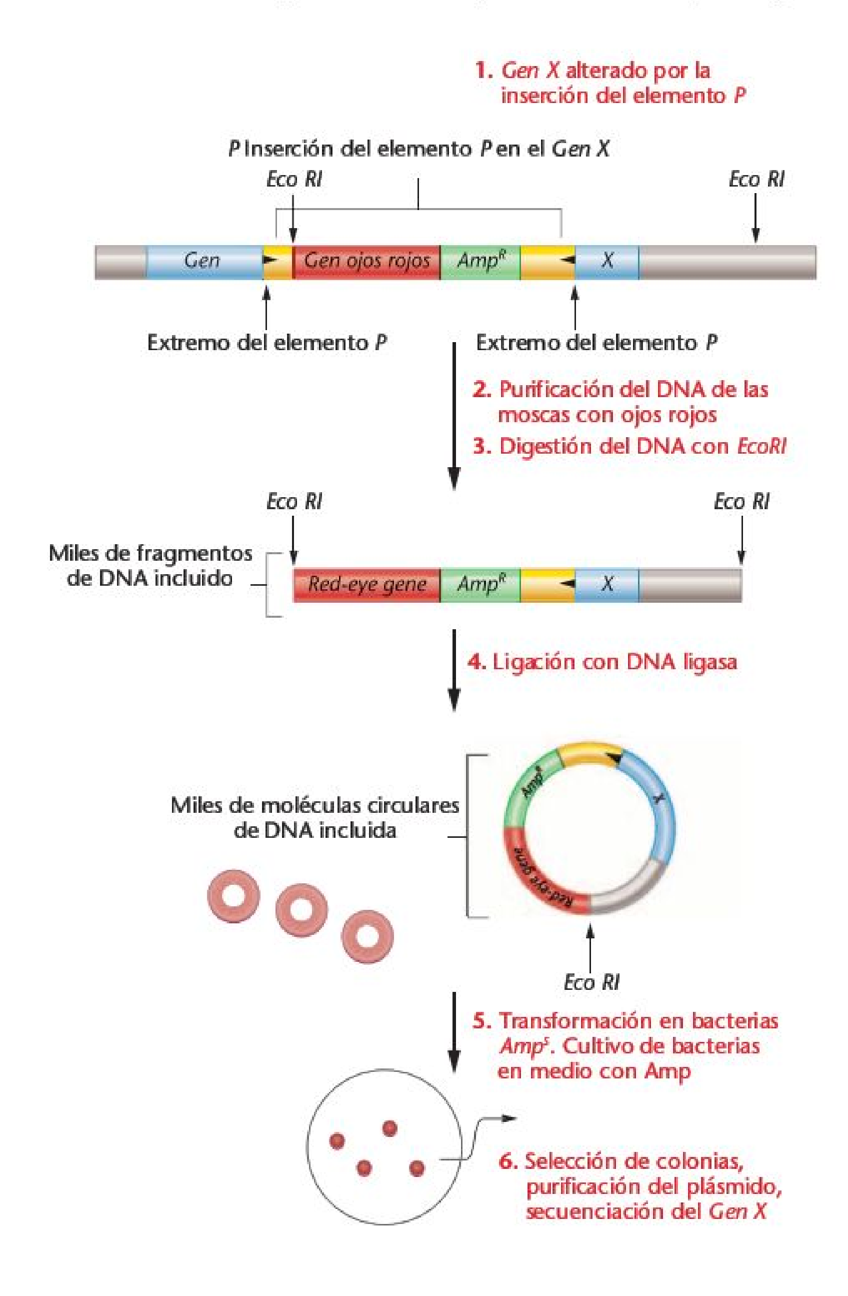
De todos los organismos modelo utilizados en investigación genética, quizás el modelo accesible más relevante para estudios de enfermedades humanas es ratón. Los ratones tienen periodos de generación relativamente cortos, de ocho a nueve semanas. Se pueden mantener fácilmente en el laboratorio, y tienen 8 o más descendientes por apareamiento. Además, el diseño corporal de ratones y humanos es parecido y experimenta pasos similares durante el desarrollo.

El genoma de ratón y el humano tienen aproximadamente el mismo tamaño (unos 3.000 millones de pares de bases de DNA), con un número parecido de cromosomas (20 pares de cromosomas en ratón). La mayor parte de los genes humanos tienen su homólogo en ratón. Es interesante destacar que a menudo los genes que en humanos están ligados en un mismo cromosoma también lo están en ratón. Los genéticos usan estas semejanzas de organización genómica para identificar y cartografiar genes en una especie una vez se han cartografiado en la otra.

A menudo, pero no siempre, los genes que presentan semejanza de secuencia en humanos y ratones controlan los mismos procesos biológicos. Puesto que generalmente las secuencias exónicas están bien conservadas entre ratones y humanos, a menudo las sondas preparadas de genes clonados en una especie se pueden usar para detectar y clonar los genes correspondientes en la otra especie.

A pesar de las muchas ventajas de usar ratones de forma experimental, su mantenimiento, apareamiento y mutagenización resulta más difícil que en eucariotas inferiores como levadura o *Drosophila*. En ratón, los rastreos genéticos a gran escala para identificar genes de interés no son fáciles de hacer. No obstante, en ratón se pueden insertar genes específicos, delecionar y someter a domiciliación génica (como se describe en la Sección 21.3). Esto hace que ratón sea un sistema útil en el que determinar la función y la regulación de genes específicos.

Una de las técnicas más importantes de disección genética en ratón es la generación de organismos transgénicos. Un ratón con un trozo foráneo de DNA (normalmente un gen o una re-



gión reguladora de un gen) introducido en su genoma se denomina ratón transgénico. El transgén puede ser un gen silvestre de otro ratón, de otro animal o de una planta, o puede ser un gen mutado *in vitro*.

El método para generar un ratón transgénico es conceptualmente muy sencillo (Figura 21.6). Los investigadores aíslan ovocitos recién fecundados de una hembra de ratón e inyectan DNA transgénico purificado en su núcleo. Entonces las células huevo se colocan en el oviducto de una hembra de ratón pseudopreñada. En el 20-50 por ciento de las células huevo inyectadas, el DNA transgénico se inserta en un cromosoma por recombinación, debido a las acciones de las enzimas de reparación del DNA que se encuentran de manera natural. Para verificar que el transgén se encuentra en el genoma del animal, los investigadores rastrean los ratones transgénicos obteniendo un trozo de su cola, purificando su DNA y realizando una transferencia de Southern o un análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si el DNA integrado se encuentra presente en las células de la línea germinal, toda la descendencia del ratón heredará el transgén. Entonces, mediante apareamientos consanguíneos se pueden generar líneas transgénicas homocigotas.

Seminario Web 21.1
Creando un ratón

(a)



(b)



FIGURA 21.6 (a) Científico microinyectando DNA clonado en una célula huevo fecundada. Las inyecciones se realizan manipulando la célula huevo y la aguja de microinyección bajo un microscopio óptico, que se ve al fondo de la imagen. La inyección se muestra en la pantalla que hay al frente. La célula huevo se sujeta con una pipeta de succión (a la derecha de la célula huevo). (b) Ratón transgénico con su hermano no transgénico. El ratón de la izquierda es transgénico para el gen de la hormona de crecimiento de rata, clonado corriente abajo del promotor de la metalotioneína de ratón. Cuando el ratón transgénico fue alimentado con cinc, el promotor de la metalotioneína indujo la transcripción del gen de la hormona de crecimiento, lo que estimuló el crecimiento del ratón transgénico.

Una de las utilizaciones más comunes de los ratones transgénicos es determinar la función de genes humanos que han sido previamente clonados. Por ejemplo, como se describe en el Capítulo 7, los genéticos verificaron la función del gen *SRY* humano inyectando el gen *Sry* de ratón en células huevo de ratón XX normales. Los ratones XX transgénicos se desarrollaron como machos, lo que demostró que *SRY* desempeña una función importante para iniciar el desarrollo de macho. En la Sección 21.5 se describe un ejemplo de cómo Lou Gehrig está usando ratones transgénicos para idear terapias contra enfermedades.

Una manera en que los genéticos pueden diseccionar la función normal de un gen es clonarlo al lado de una región reguladora que provoque que el gen se exprese en un momento o en un sitio anormal, o en cantidades superiores a las normales. Esta estrategia se usó para determinar la función que desempeña el oncogén *c-myc* humano en el desarrollo de varios cánceres.

Antes de los estudios con transgénicos, las pruebas que relacionaban el gen *c-myc* y el cáncer en humanos eran mayoritariamente circunstanciales. La mayoría de las células normales contienen niveles bajos de proteína Myc, pero muchas células cancerosas contienen niveles elevados, o niveles que no se regulan de forma normal durante el ciclo celular. Además, en cánceres como el linfoma de Burkitt, el gen *c-myc* se encuentra interferido por translocaciones recíprocas específicas que sitúan este gen al lado de los promotores y los intensificadores del gen de las inmunoglobulinas. A pesar de esta evidencia de la relación entre la expresión de *c-myc* y el cáncer, los investigadores todavía cuestionaban si la expresión anormal del gen *c-myc* era directamente responsable de la formación de cáncer en los glóbulos blancos y en otros tejidos (como el tejido de mama). En un estudio, los investigadores clonaron el gen *c-myc* al lado del intensificador del gen de la inmunoglobulina e introdujeron este transgén en ratones. Los ratones transgénicos resultantes expresaban altos niveles de mRNA de *c-myc* en las células sanguíneas, y mostraban una tasa superior a la normal de linfoma y leucemia. En otro estudio, los investigadores clonaron el gen *c-myc* al lado del promotor del virus de tumor de mama de ratón, y generaron ratones transgénicos que llevaban este transgén. El transgén se expresó en niveles altos en mama y en otros tejidos, y aproximadamente el 50 por ciento de los ratones transgénicos desarrollaron cánceres a la edad de 14 meses. Los resultados de estos estudios confirmaron que el gen *c-myc* es un determinante importante en el desarrollo de una gama de diferentes cánceres. Sin embargo, puesto que no todos los tejidos que expresaban el gen *c-myc* desarrollaban cánceres, los investigadores concluyeron que la expresión inadecuada de *c-myc* no es suficiente para el desarrollo tumoral. Estos estudios también ilustraron que se deben producir diver-

sos cambios genéticos en una célula para que desarrolle una malignidad completa (como se discutió en el Capítulo 18).

Una segunda técnica de disección génica importante en ratones es el *knockout*[1] génico y su técnica hermana, el reemplazo domiciliado de genes. En conjunto, estas técnicas se conocen como **domiciliación génica**. Un ratón *knockout* es una cepa de ratón pura que carece de la función de un gen porque éste ha sido reemplazado por un alelo nulo o por un alelo mutagenizado específico. Los genéticos usan los ratones *knockout* como modelos para algunas enfermedades genéticas humanas. Para generar un modelo en ratón de una enfermedad genética humana, los investigadores clonan el gen de ratón que sea homólogo al gen que causa la enfermedad humana, lo someten a mutagénesis específica de sitio, y después reemplazan el gen normal de ratón por el alelo mutagenizado. Usando esta tecnología se han generado modelos en ratón de fibrosis quística y de distrofia muscular de Duchenne. Los genéticos también utilizan ratones *knockout* para estudiar el control genético del desarrollo inicial y del comportamiento. En la sección 21.3 se describe la tecnología para generar *knockout* y reemplazamientos génicos en ratones.

Ahora resuelva esto

El Problema 21.2 de la página 639 le pide que seleccione un organismo modelo adecuado en el que estudiar unos cuantos procesos genéticos y enfermedades humanas, desde la división celular hasta la fibrosis quística.

Sugerencia: Para responder a esta pregunta, podría considerar las limitaciones y las ventajas de usar cada uno de los organismos modelo discutidos en este capítulo. Entonces, piense cómo estas características afectarían la investigación en cada uno de estos temas de investigación.

21.2 Los genéticos diseccionan la función génica usando mutaciones y genética directa

En esta sección se exploran los métodos usados en el análisis genético clásico, denominado a veces **genética directa**. El análisis por genética directa empieza con el aislamiento de mutantes que muestran diferencias fenotípicas en el proceso de interés. Al aislamiento de los mutantes le sigue la definición de las **rutas genéticas**, la clonación del gen y la generación de más mutantes para entender la ruta biológica. De esta manera, los mutantes definen la función normal del gen.

Generación de mutantes con radiación, productos químicos e inserción de transposones

El primer paso en el análisis por genética directa es definir una pregunta experimental; por ejemplo, ¿qué genes controlan el desarrollo inicial de un sistema orgánico? El siguiente paso es predecir los tipos de fenotipos que emergerían si los genes implicados estuviesen mutados.

A veces los genéticos examinan mutaciones naturales que se producen espontáneamente; sin embargo, como se vio en el Capítulo 15, generalmente las mutaciones son poco frecuentes en la naturaleza. Por ejemplo, los ratones experimentan una mutación por cada 100.000 genes por generación. Los investigadores necesitarían rastrear millones de moscas del vinagre, de células de levadura o de ratones para detectar una mutación relevante.

El proceso de búsqueda de mutaciones mejora si se mutageniza el organismo modelo antes de rastrear la presencia de mutaciones. El objetivo es generar una mutación aleatoria en el genoma de cada organismo de una población de manera que sólo se interfiera un producto génico en cada organismo, dejando el resto del organismo salvaje. Cuando la mutagénesis es suficientemente exhaustiva, de modo que cada gen se ha mutagenizado al menos una vez en la población tratada, se dice que la mutagénesis está **saturada**.

Como se vio en el Capítulo 15, cualquier sustancia que altere la secuencia del DNA es mutagénica. En el análisis genético se prefieren determinados mutágenos por el tipo de mutaciones que provocan. Por ejemplo, la radiación ionizante provoca roturas cromosómicas, deleciones, translocaciones y otras reordenaciones importantes. Probablemente las mutaciones generadas con radiación ionizante sean mutaciones nulas, las cuales pueden tener efectos graves sobre el fenotipo. En cambio, la luz ultravioleta y determinados productos químicos como el sulfonato de etil metano (EMS) y la guanidina nitrosa causan cambios de un solo par de bases o pequeñas deleciones e inserciones. Con estos agentes mutagénicos puede surgir una gama de mutaciones desde poco graves hasta severas, en función del sitio del gen donde se produzca la lesión. Es más probable que una mutación de un único par de bases resulte en la generación de mutaciones condicionales, como mutaciones de sensibilidad a la temperatura, que son especialmente útiles para estudiar funciones génicas esenciales.

Los genéticos también utilizan transposones para generar mutaciones. La inserción aleatoria de un transposón en el genoma, como un elemento *P* de *Drosophila*, puede causar una alteración importante de la función génica. Generalmente estas grandes inserciones generan mutaciones nulas si la transposición ocurre dentro del ORF de un gen. Pueden generar diversos efectos distintos sobre la expresión génica si se transponen

[1] *Nota del traductor:* los *knockouts* génicos, también denominados mutaciones nulas, son mutantes de pérdida de función, aunque suele utilizarse la expresión inglesa *knockout*, que significa «dejar fuera de combate».

a la región reguladora de un gen, tanto en las regiones que lo flanquean como dentro de sus intrones.

Rastreo de mutantes

¿Cómo se detectan los mutantes, cómo se cultivan y cómo se mantienen una vez se han mutagenizado los organismos? La mayoría de mutaciones tienen por consecuencia la pérdida de la función génica. Además, la mayoría de mutaciones de pérdida de función son recesivas, y generalmente en los organismos diploides el alelo silvestre del otro cromosoma dirigirá la síntesis de suficiente producto normal para producir el fenotipo normal. Para complicar más la situación, muchos mutantes recesivos de pérdida de función son letales, puesto que la mayor parte de los productos génicos son esenciales para el desarrollo y la función biológica adecuados.

En algunos casos, una mutación será dominante. En este caso, en un organismo diploide, el gen silvestre del otro cromosoma no puede producir suficiente producto génico normal para superar los efectos del gen mutante, o bien el producto génico mutante interfiere con la función del producto normal. Si la mutación es dominante, el fenotipo mutante se observará de inmediato, incluso en un organismo diploide.

El método más directo que usan los genéticos para detectar mutantes es el **rastreo genético**. Con frecuencia, un rastreo genético implica el examen visual de grandes cantidades de organismos mutagenizados. Por ejemplo, el rastreo utilizado para seleccionar mutantes de ciclo celular en levadura (Sección 21.5) precisó inicialmente análisis fotomicroscópico en un lapso de tiempo de miles de colonias de levadura creciendo a dos temperaturas diferentes. Los investigadores detectaron células con mutaciones en genes reguladores del ciclo celular examinando la relación del tamaño de la yema respecto de la célula madre de levadura, que es indicativo de la detención del crecimiento en puntos específicos del ciclo celular. De forma parecida, el rastreo de mutaciones de *Drosophila* que afectasen a su desarrollo y segmentación (Sección 21.5) precisó la inspección visual de miles de cepas de *Drosophila* para seleccionar aquellas que careciesen de descendientes de ojos de color blanco. Entonces los investigadores siguieron el rastreo inspeccionando microscópicamente miles de larvas para buscar la presencia de patrones de segmentación corporal anormales.

Es fácil ver cómo se pueden detectar las mutaciones dominantes durante un rastreo genético. Mientras la mutación dominante no sea letal, el fenotipo será visible inmediatamente en cualquier organismo que lleve una mutación dominante en el gen relevante. Entonces el mutante se puede cruzar, y se pueden mantener reservas heterocigotas o homocigotas. Si la mutación dominante es letal, generalmente ya no se detectará.

Sin embargo, es más probable que las mutaciones sean recesivas. Los organismos haploides como levadura tienen una ventaja importante para la detección de mutaciones recesivas, ya que el fenotipo mutante se hará evidente de inmediato en el organismo mutado. La detección de mutaciones recesivas en organismos diploides como *Drosophila* o en ratones requiere que el organismo mutado se aparee, y que la progenie F_1 se cruce entre sí para revelar la cuarta parte de los descendientes F_2 que serán homocigotos para el alelo recesivo.

Pero, ¿cómo detectan los genéticos las mutaciones recesivas que ocurren en genes esenciales?

Las mutaciones letales recesivas no se detectarán en organismos haploides como levadura. Para superar esta limitación, los genéticos de levadura aíslan mutaciones condicionales. Una **mutación condicional** es aquella que permite que el producto génico mutante funcione normalmente bajo una **condición permisiva** (generalmente a temperatura normal de cultivo), pero que funciona anormalmente bajo una **condición restrictiva** (normalmente una temperatura más alta). La sensibilidad a la temperatura ocurre porque la proteína codificada por el gen mutado se pliega incorrectamente y pierde su funcionalidad a altas temperaturas. La estrategia para seleccionar mutaciones letales recesivas sensibles a la temperatura es sencilla (Figura 21.7). Tras la mutagénesis, se permite que las células de levadura crezcan en colonias en medio de cultivo en una placa de Petri, a 23ºC. Entonces se hace presión sobre las colonias con un paño estéril, y algunas células de levadura de cada colonia se transfieren al paño. Entonces se presiona el paño sobre nuevas placas que contengan medio de cultivo estéril. Las células de levadura se transfieren del paño a las placas réplica. Una placa réplica se incuba a temperatura permisiva, y la otra a temperatura restrictiva. Las colonias de levadura que no crecen a temperatura restrictiva pueden contener mutaciones letales recesivas sensibles a la temperatura. Entonces los investigadores vuelven a la placa original, que crece a temperatura permisiva, y seleccionan la colonia para nuevos análisis. Hartwell y sus colaboradores aislaron 150 mutantes de ciclo celular usando esta estrategia. (Véase la Sección 21.5.)

Los organismos diploides que son heterocigotos para un alelo letal recesivo no mostrarán el fenotipo mutante, y los que sean homocigotos para el alelo mutante morirán. Así, pues, ¿cómo es posible detectar mutaciones letales recesivas en una población de organismos doploides?

Los genéticos han ideado algunas estrategias complicadas para detectar y recuperar mutaciones letales recesivas en organismos diploides. Un ejemplo de un método para detectar mutaciones letales recesivas en la **técnica de *ClB***. Herman Muller ideó esta técnica en la década de 1920 para demostrar que los rayos X causan mutaciones en *Drosophila*. La técnica *ClB* detecta mutaciones letales recesivas en el cromosoma X (Figura 21.8). Para realizar esta técnica, los investigadores tratan machos silvestres con un mutágeno como por ejemplo radiaciones, y luego aparean estos machos con hembras heterocigotas *ClB* no tratadas. Estas moscas hembra *ClB* contienen un cromosoma X balanceador con tres características importantes. Primero, el cromosoma balanceador contiene inversiones que evitan los entrecruzamientos (que se designa con la letra *C*). Segundo, contiene un alelo letal recesivo (*l*) que elimina los descendientes homocigotos para el balance-

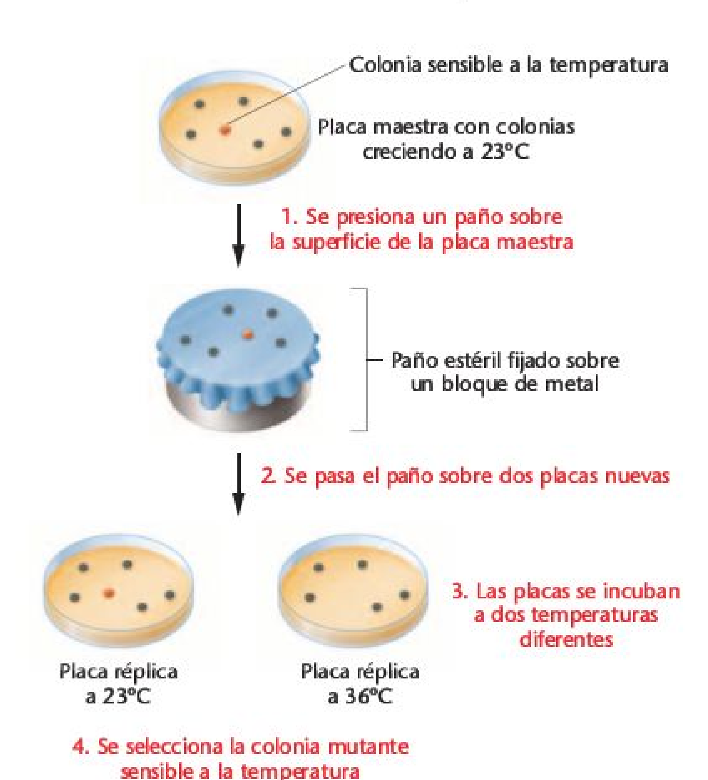


FIGURA 21.7 Técnica de la siembra de réplicas. Después de la mutagénesis, las células de levadura se siembran en placas que contienen medio de cultivo. Algunas células de las colonias que han crecido a partir de una sola célula se transfieren a un paño estéril. Las células se transfieren del paño a dos placas nuevas. Las placas réplica se incuban tanto a temperatura permisiva (23°C) como a temperatura restrictiva (36°C). Se seleccionan las colonias que no crecen a temperatura restrictiva. Estas colonias tienen mutaciones de sensibilidad a la temperatura.

ador. Tercero, el cromosoma balanceador lleva un gen dominante para ojos *Bar* (*B*), lo que hace posible inspeccionar visualmente los descendientes para buscar la presencia del cromosoma *ClB*.

A continuación, los investigadores seleccionan hembras F1 individuales con ojos Bar. Estas hembras tienen un cromosoma X de su madre (el cromosoma *ClB*) y un cromosoma X de su padre (que pude ser que contenga una mutación letal recesiva acabada de inducir). Entonces los investigadores cruzan todas las hembras con ojos Bar con machos silvestres. Si el cromosoma X paterno contiene una mutación letal recesiva, la progenie de este retrocuzamiento no presentará machos viables. La mitad de ellos morirán porque son hemicigotos para el cromosoma *ClB* (el gen *l* es letal), y la otra mitad morirá porque son hemicigotos para el alelo letal acabado de inducir. La ausencia de machos señala la presencia de una mutación letal recesiva en el cromosoma X. Es posible mantener la mutación en la población seleccionando las hembras silvestres (con ojos rojos redondos) y retrocruzándolas.

Los genéticos también han ideado técnicas para detectar mutaciones letales recesivas en los autosomas, como se describe en la Sección 21.5.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo saben los genéticos si una mutación en uno de los cuatro cromosomas de *Drosophila* es una letal recesiva, dominante o no letal recesiva?

Selección de mutantes

En un rastreo genético se debe examinar cada individuo por separado para detectar el fenotipo de interés. A menudo se deben rastrear decenas de miles de individuos para encontrar el número necesario de mutaciones. Aunque es efectiva, obviamente esta estrategia es costosa y lenta. En algunos casos se puede emplear un método diferente que reduce la cantidad de trabajo y de tiempo, denominado **selección**. El objetivo de la selección es generar condiciones que eliminen los organismos silvestres o mutantes irrelevantes de la población dejando sólo los mutantes que se buscan. Generalmente, esto se consigue matando o inhibiendo el crecimiento de los organismos que no muestran el fenotipo relevante.

La selección es sencilla si el fenotipo mutante incrementa su supervivencia bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, un gen mutante que confiera resistencia a una droga puede ser fácilmente seleccionable si los organismos se cultivan en un medio que contenga la droga. Del mismo modo, se puede seleccionar una mutación que corrija un defecto en una ruta metabólica, como por ejemplo la incapacidad de metabolizar galactosa, si los organismos se cultivan en un medio que solo contenga galactosa como fuente de carbono.

Aunque algunas mutaciones permiten una selección directa, la mayoría no lo permiten puesto que son mutaciones de pérdida de función. Sin embargo, los genéticos pueden usar la selección para estudiar las **mutaciones supresoras** (mutaciones que reestablecen la función normal en un mutante de pérdida de función preexistente). Las mutaciones supresoras ayudan a definir otros genes en una ruta con múltiples pasos que conduzca al fenotipo de interés, como se describe a continuación.

Definición de los genes

El objetivo de la disección genética es descubrir todos los genes que afectan un fenotipo y determinar cómo funcionan. Por eso es importante definir el número de genes que conducen a un fenotipo específico.

Como se ha visto en capítulos anteriores, un solo gen puede tener diversos alelos diferentes, alelos débiles, nulos o variantes con distintos fenotipos. Por ejemplo, los grupos sanguíneos ABO representan tres alelos diferentes del mismo locus que pueden conducir a seis genotipos diferentes y a

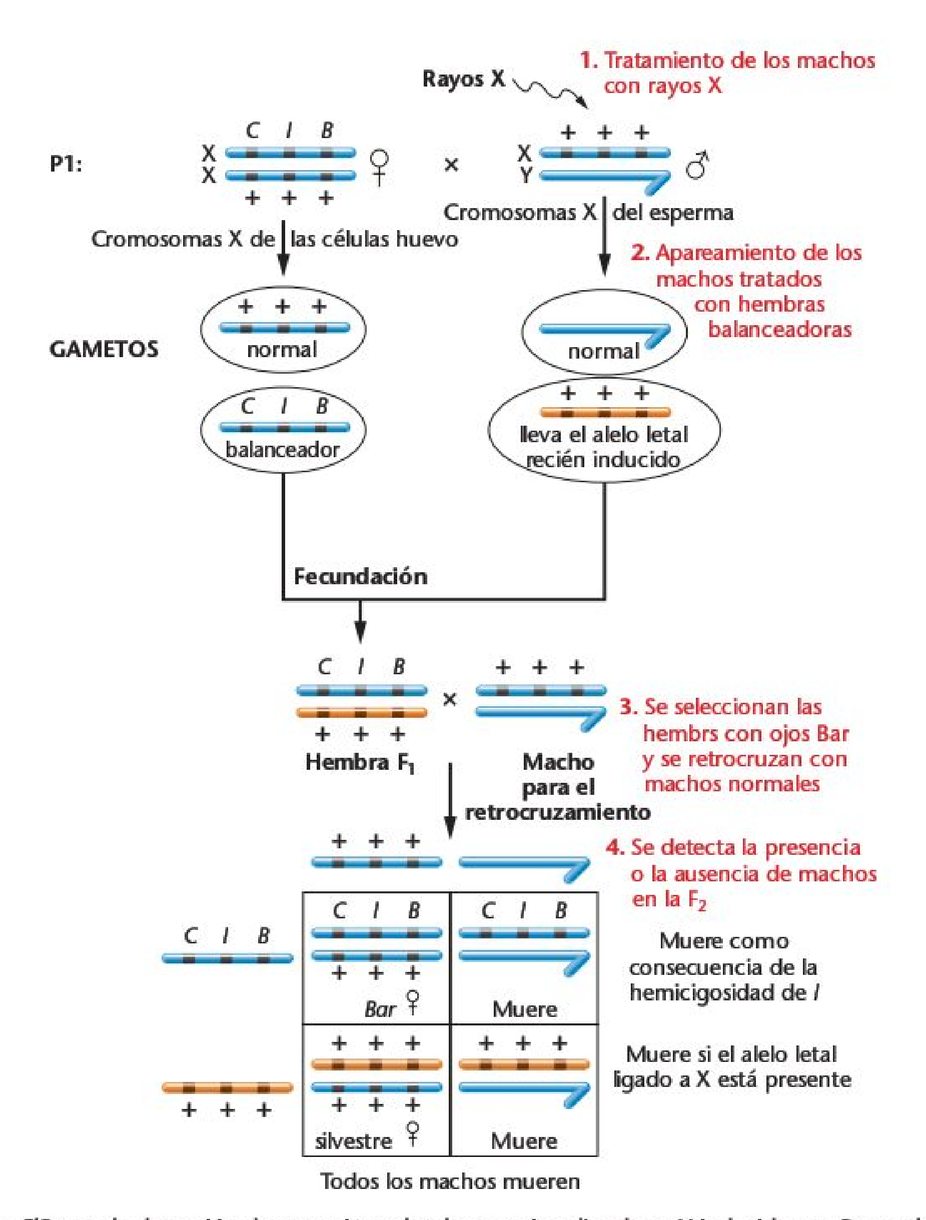


FIGURA 21.8 Técnica *ClB* para la detección de mutaciones letales recesivas ligadas a X inducidas en *Drosophila*.

cuatro fenotipos diferentes (Véase el Capítulo 4.) Los alelos I^A e I^B dirigen la síntesis de los antígenos A y B, y el alelo I^O es nulo, siendo no funcional. Los alelos I^A e I^B son codominantes, y el alelo I^O es recesivo respecto los otros dos. También es posible que un gen actúe en una ruta multigénica que conduzca a un fenotipo particular. Una mutación en cualquiera de los genes de una ruta puede resultar en el mismo fenotipo, ya que cada producto génico mutante evita que la ruta funcione. Por ejemplo, el gen representado por los alelos I^A, I^B e I^O actúa dentro de la misma ruta que el gen representado por el alelo *H*. Como se vio en el Capítulo 4, las personas con una mutación nula homocigota en el gen *H* muestran el mismo fenotipo que las que presentan el genotipo I^O homocigoto.

¿Cómo pueden determinar los genéticos si las mutaciones en la colección de organismos mutantes representan alelos de un mismo gen, o si representan mutaciones en diversos genes diferentes de una misma ruta?

Para hacerlo, los genéticos realizan análisis de complementación y de recombinación. El **análisis de complementación** permite a los investigadores determinar si dos mutaciones se encuentran en el mismo gen, es decir, si son alelos, o si representan mutaciones en genes separados. Para realizar análisis de complementación, los investigadores cruzan dos cepas mutantes homocigotas y examinan la progenie F_1. Hay dos posibles resultados e interpretaciones de un cruzamiento de este tipo, que se ilustran en la Figura 21.9. Un posible resultado es que toda la progenie sea silvestre. En este caso, se ha producido complementación: por lo tanto, las dos mutaciones deben yacer en genes separados. La complementación ocurre cuando la progenie F_1 es heterocigota para cada gen, y el alelo silves-

tre de cada locus dirige la síntesis de una proteína silvestre que es requerida para el fenotipo normal. El otro resultado posible es que toda la progenie F_1 sea mutante. En este caso, no ha ocurrido complementación; por lo tanto, las dos mutaciones yacen en el mismo gen. La complementación no se produce cuando ambos alelos del gen están mutados y no se sintetiza ningún producto silvestre.

En análisis de complementación puede usarse para rastrear cualquier número de mutaciones individuales que resultan en el mismo fenotipo. Se dice que todas las mutaciones que están presentes en un mismo gen forman parte del mismo **grupo de complementación**, y complementarán mutaciones en todos los otros grupos. Si se dispone de un gran número de mutaciones que afectan un mismo carácter y se estudian mediante análisis de complementación, es posible predecir el número total de genes implicados en la determinación de ese carácter. En el Capítulo 15 se discutió cómo se usa el análisis de complementación para estudiar los genes implicados en la enfermedad hereditaria humana xeroderma pigmentosum. Los resultados de estos estudios revelaron que la presencia de mutaciones en cualquiera de siete grupos de complementación (genes) puede conducir a la enfermedad. Más tarde en este capítulo veremos como Leland Wartwell y sus colaboradores han usado el análisis de complementación para mostrar que hay 32 genes, que representan 150 mutantes aislados independientes, regulando pasos del ciclo celular en levadura. Los Drs. Nüslein-Volhard y Wieschaus realizaron análisis de complementación en su colección de 580 mutantes de patrón embrionario. Estos mutantes cayeron en 139 grupos de complementación, definiendo el número de genes de *Drosophila* que afectan el desarrollo embrionario.

Las mutaciones dominantes no pueden analizarse por complementación, pero pueden analizarse mediante **análisis de recombinación**. El análisis de recombinación proporciona una estimación de ligamiento genético calculando la cantidad de recombinación (entrecruzamiento) que ocurre entre loci mutantes cuando se encuentran en el mismo organismo. Si dos mutaciones se localizan en un mismo gen, están estrechamente ligadas. Si se encuentran en genes diferentes, lo más probable es que no estén ligadas. En el Capítulo 5 se describieron los métodos que se usan en levadura, en *Drosophila* y en otros organismos para calcular ligamiento por entrecruzamiento y recombinación.

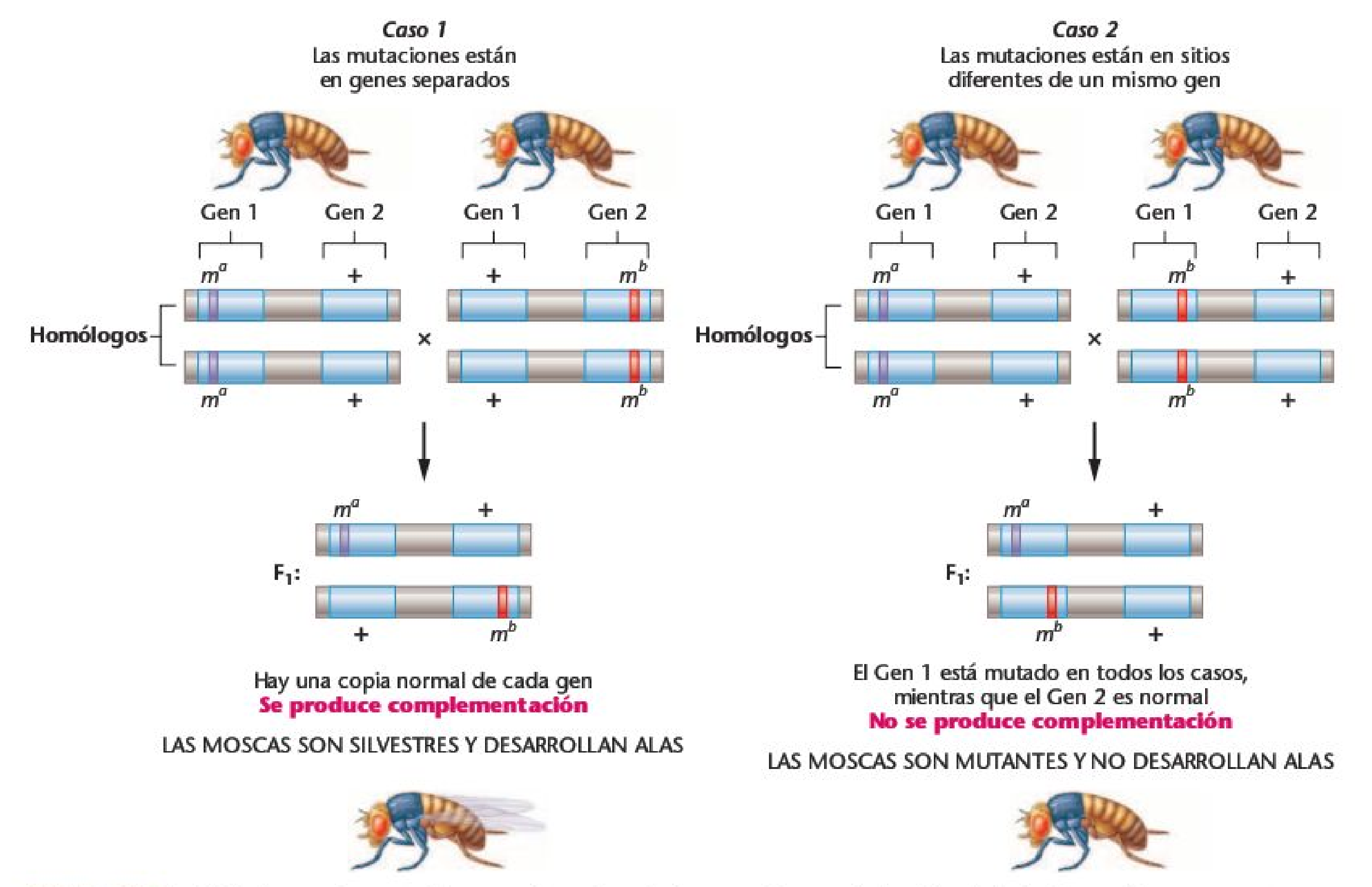


FIGURA 21.9 Análisis de complementación para determinar si dos mutaciones *wingless* (sin alas) de *Drosophila* se encuentran en genes separados o en un mismo gen.

Disección de redes genéticas: epistasis y rutas

Los productos de diferentes genes pueden actuar en una ruta que conduce a un fenotipo particular. Si los análisis de complementación o de recombinación revelan que hay dos o más genes que contribuyen al mismo fenotipo, pueden estar actuando en la misma ruta. Entonces, ¿cómo determinan los genéticos donde operan estos genes en una misma ruta? Una manera de hacerlo es examinando cómo dos genes mutantes interaccionan durante un análisis de epistasia. Como se vio en el Capítulo 4, la epistasis se produce cuando el efecto de un gen enmascara o modifica el efecto de otro gen. Si un gen es epistásico para otro, la mutación en el gen cuyo efecto se manifiesta antes en la ruta será aquel cuyo fenotipo sea evidente en un mutante doble. Para que funcione el análisis de epistasia, cada mutante debe mostrar un fenotipo ligeramente diferente.

Para realizar un análisis de epistasia, se cruzan dos mutantes recesivos homocigotos y se examina la progenie F_2. Las proporciones fenotípicas de la progenie F_2 revelan cual de los des genes controla el paso anterior o posterior de la ruta. (Véase el Capítulo 4.) Alternativamente, se puede generar un organismo doble mutante, homocigoto para ambas mutaciones, y se determina el fenotipo de este doble mutante. Si el fenotipo del doble mutante es el mismo que el de uno de los mutantes sencillos, probablemente esa mutación sencilla representa el paso anterior de la ruta (Figura 21.10). Sin embargo, se debe tener presente que hay otros tipos de interacciones génicas que pueden ser epistásicas entre sí, aunque puede que no operen en la misma ruta bioquímica. Por lo tanto, es necesario realizar otros ensayos genéticos y bioquímicos antes de diseccionar completamente una ruta genética.

En su análisis genético del ciclo celular en levadura, Hartwell y sus colaboradores construyeron dobles mutantes de cada uno de sus mutantes sencillos. (Véase la Sección 21.5.) Su análisis mostró que un mutante con un defecto en un gen que controla el primero de los seis estadios del ciclo celular no podía completar los cinco estadios restantes. De forma parecida, los mutantes con un defecto en un gen que controla el segundo de estos estadios se detenían en el segundo estadio y no podían completar los restantes cuatro estadios. Un doble mutante que contenía ambas mutaciones se detenía en el primer estadio, lo que confirmó que el primer mutante contenía una mutación en un gen que controla un paso anterior al del segundo mutante. Usando esta estrategia, los investigadores ordenaron las 32 mutaciones de ciclo celular en seis estadios de la ruta del ciclo celular de levadura.

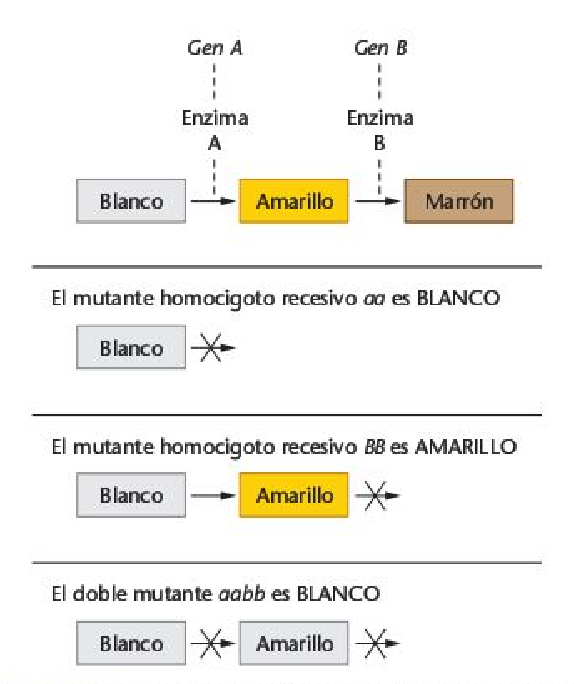


FIGURA 21.10 Ejemplo de análisis de epistasis para dos genes que controlan pasos en una ruta bioquímica que convierte un pigmento de pelaje sin color a color amarillo, y después a marrón. El pelaje silvestre es de color marrón. El doble mutante (*aabb*) muestra el mismo fenotipo que el mutante sencillo (*aa*). Esto demuestra que el *Gen A* controla un paso anterior al controlado por el *Gen B*.

Extensión del análisis: supresores e intensificadores

Puede que el análisis genético directo sólo identifique algunos genes de una ruta. Es posible que el procedimiento original de mutagénesis no haya mutagenizado todos los genes de la ruta o que en el rastreo no se recuperasen todos los genes. ¿Cómo pueden los genéticos encontrar los otros genes de la ruta, si solo se han mutado unos cuantos?

Una manera para identificar otros genes en una ruta es realizar un segundo rastreo de mutagénesis. El objetivo de este segundo rastreo es identificar genes que intensifiquen o supriman de manera dominante el primer fenotipo mutante. Para realizar el segundo rastreo, los genéticos someten la primera cepa mutante a una segunda ronda de mutagénesis, y rastrean en busca de fenotipos más severos o más suaves.

Una **mutación supresora** es una segunda mutación que rescata el fenotipo mutante original. Por ejemplo, un mutante de levadura sensible a la temperatura que no puede replicar su genoma a temperatura restrictiva puede sufrir una segunda mutación que devuelva el mutante al fenotipo silvestre en términos de replicación del DNA. Hay diversos mecanismos de funcionamiento de las mutaciones supresoras (Figura 21.11). Se puede producir una mutación en un gen que codifica una proteína que normalmente interaccionaría con la proteína codificada por el primer gen mutante. En el organismo mutante original, las dos proteínas no interaccionarían porque la primera proteína sería anormal, quizás debido a un plegamiento incorrecto, lo que no le permitiría unirse a la proteína acompañante. Sin embargo, en presencia de un supresor, las dos proteínas anormales interaccionan, restaurando la función. Otro tipo de mutación supresora se puede producir en una ruta diferente, pero cuando esta otra ruta está mutada puede sustituir la ruta anormal del primer mu-

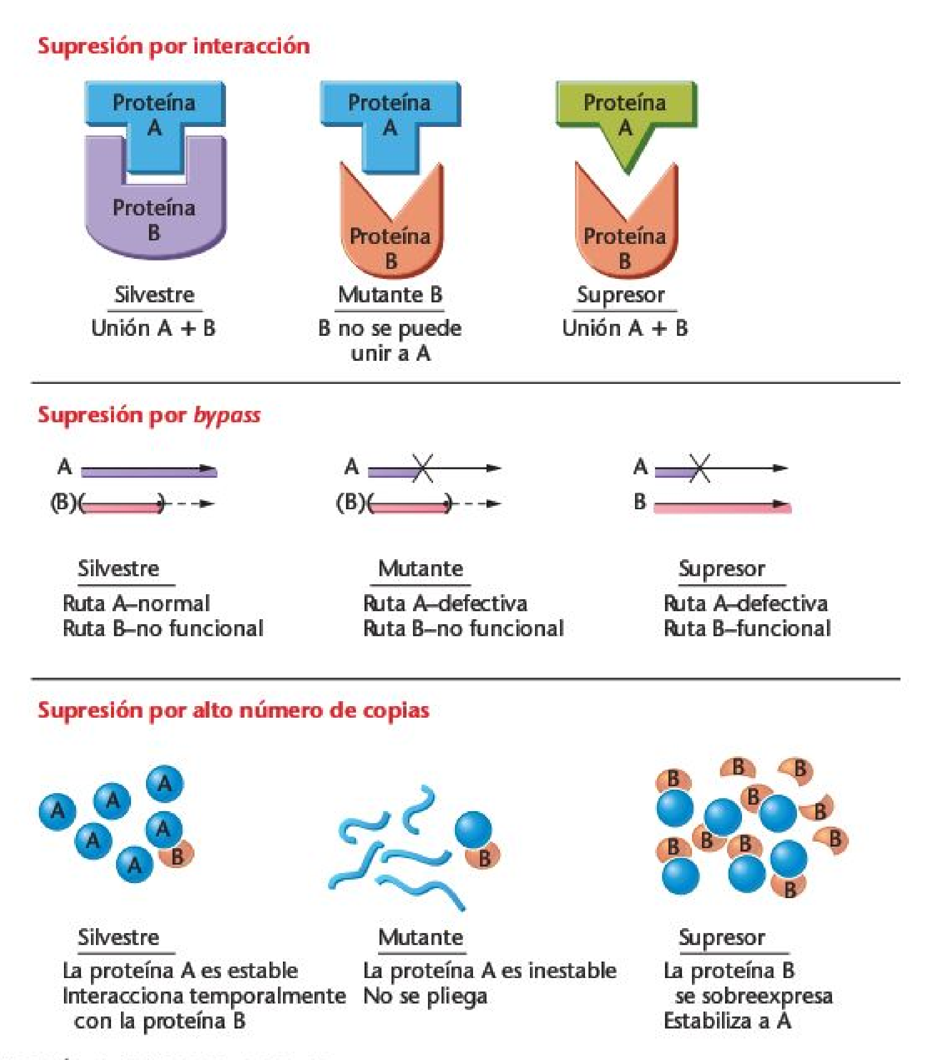


FIGURA 21.11 Tres tipos de mutaciones supresoras.

tante o bien superarla. Un tercer tipo de supresor es el supresor de altas copias. Estos supresores rescatan el primer mutante suministrando altos niveles de otro producto génico que puede compensar o estabilizar el producto génico mutado anormal. Los genéticos usan estos tipos de supresores para definir otros genes implicados en una ruta genética.

No todas las mutaciones supresoras son útiles para identificar otros genes de la ruta. A veces, la mutación supresora se produce en el mismo gen que la primera, corrigiendo el defecto. Esto podría ser una reversión directa de la mutación original o una segunda mutación en el mismo gen que corrija el defecto. Un ejemplo de ello es una mutación que reestablezca la pauta de lectura correcta. Además, una mutación supresora sin sentido en un gen de tRNA que permita que un codón de terminación en un gen mutado sea reconocido como un codón para un aminoácido también puede ser un supresor, ya que permite que se traduzca una proteína funcional a partir del gen mutado.

Las **mutaciones intensificadoras** son las contrarias a las **mutaciones supresoras**; incrementan la intensidad del primer fenotipo mutante. Los genéticos usan las mutaciones intensificadoras de manera parecida a como utilizan las mutaciones supresoras, ya que señalan otros genes de la ruta genética.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos cuántos genes contribuyen a un fenotipo particular en un organismo modelo?

Extensión del análisis: clonación de los genes

Una vez los genéticos han generado mutantes y han definido las redes genéticas, los genes implicados se identifican por clonación. Ahora que los genomas de muchos organismos modelo están completamente secuenciados y los ORFs de su genoma identificados, el trabajo de clonar se ha simplificado enormemente.

En levadura, es posible clonar genes por **complementación funcional** con una biblioteca de cDNA de levadura. En este método, la cepa mutante se transforma de forma metódica con plásmidos que contienen todos los genes silvestres de levadura, hasta que un clon de cDNA restaura la condición silvestre del mutante. Entonces se purifica el clon de cDNA que lo ha restaurado a partir de la cepa transformada de levadura, y se determina la secuencia del cDNA. Luego se identifica el gen complementado buscando la secuencia genómica de levadura a partir de la secuencia plasmídica desconocida. Una vez se ha identificado el gen silvestre correspondiente al gen mutado, este gen silvestre clonado se puede usar para aislar el gen mutante a partir del organismo mutante. Los genéticos pueden diseñar cebadores para PCR basados en la secuencia de DNA del gen silvestre. Entonces utilizan estos cebadores para amplificar todo o una parte el gen mutado del organismo mutante. Los fragmentos amplificados de DNA se pueden secuenciar directamente para identificar la naturaleza de la mutación que condujo al fenotipo mutante.

Aunque hay otros organismos modelo, como *Drosophila* y ratón, que pueden transformarse con clones de cDNA o de DNA genómica, este proceso no es suficientemente eficiente en estos organismos para permitir la clonación por complementación funcional. Así, pues, ¿cómo pueden los genéticos clonar un gen basándose en el fenotipo mutante de estos organismos?

El primer paso para clonar genes de organismos superiores es cartografiar la posición del gen mediante análisis de ligamiento. El gen se puede cartografiar en un cromosoma, y después en una región general del cromosoma usando el análisis de ligamiento normal, como el descrito en el Capítulo 5. Cuando se conoce la localización aproximada del gen, se puede identificar el gen candidato mediante una técnica denominada **paseo cromosómico**. Para realizar un paseo cromosómico, los investigadores determinan la secuencia de DNA de un fragmento de DNA genómico y usan ese fragmento como sonda para aislar el clon que representa el siguiente segmento. Entonces se secuencia el DNA genómico del siguiente clon y se usa de sonda para el siguiente segmento. Este proceso se va repitiendo hasta que toda la región se ha clonado y secuenciado. Los genéticos pueden identificar la presencia de ORFs dentro de la secuencia de DNA usando programas de búsqueda por ordenador. Para verificar cuál de los ORFs de esa región de DNA codifica el gen de interés, los genéticos pueden mutar específicamente o bien interrumpir los ORFs, y analizar estas mutaciones en organismos modelo, como se describe más tarde en este capítulo.

En *Drosophila*, las mutaciones generadas por la inserción de un elemento *P* se pueden clonar con facilidad, como se describió anteriormente (Figura 21.5). Los elementos P especiales con secuencias plasmídicas se pueden recuperar junto con el gen mutado, o se puede utilizar el propio elemento P como etiqueta marcadora para seleccionar el DNA correcto de una biblioteca genómica generada a partir del organismo mutante.

Extensión del análisis: funciones bioquímicas

Una vez se ha clonado el gen y se ha secuenciado su DNA, la disección genética entra en una fase nueva pero igualmente estimulante, la de definir las funciones del producto génico. Esta fase del análisis utiliza una amplia gama de tecnologías bioinformáticas, genéticas y bioquímicas.

Los genéticos pueden empezar el análisis comparando la secuencia de DNA del gen con la de otros genes del mismo o de otros organismos. Si existe un gen con una secuencia similar en otra especie y se conoce la función de ese gen, se puede usar esa información para deducir la posible función del producto génico desconocido. Los investigadores pueden analizar la secuencia de DNA del gen en busca de **motivos de secuencia** aminiacídicos en el producto génico que puedan proporcionar pistas sobre la función del producto génico. Por ejemplo, el gen puede contener una secuencia que codifica un motivo quinasa, sugiriendo que el gen codifica una enzima que fosforila otras proteínas. O puede que el gen contenga una secuencia que codifica una región de unión al DNA que se encuentra en determinados tipos de factores de transcripción, sugiriendo que el gen desconocido regula la expresión de otros genes. Este tipo de hipótesis pueden analizarse con nuevos ensayos bioquímicos o genéticos.

Los investigadores aplican una amplia gama de **herramientas genéticas moleculares** para continuar el análisis de los genes candidatos. Estas herramientas incluyen analizar la expresión génica en tejidos específicos, durante periodos concretos del desarrollo, o en regiones de la célula durante el ciclo celular. Los investigadores también pueden examinar si hay otras proteínas que interaccionan con el producto codificado por el gen, usando diversos ensayos bioquímicos y genéticos. Una gama de las potentes herramientas que se usan actualmente para definir la función génica son la mutagénesis específica de sitio, el reemplazo génico, los *knockouts* génicos y el examen de fenotipos en organismos transgénicos. Estos métodos se describen en la siguiente sección.

Ahora resuelva esto

El Problema 21.25 de la página 640 implica la planificación de un rastreo para buscar genes que afecten a un fenotipo visible; en este caso, el oscurecimiento y el endurecimiento de la cutícula de *Drosophila* adultas.

Sugerencia: Aunque el fenotipo es visible, también debe considerar la posibilidad de letalidad en cualquier estadio del ciclo biológico de esta mosca. En la Sección 21.2 aprendió los métodos que se usan para recuperar mutaciones letales en *Drosophila*. La última parte del problema trata de un resultado negativo de un rastreo, ya que no se aislaron mutantes. Para sugerir razones para este resultado, podría considerar aspectos como la propia mutagénesis o cómo se realizó el rastreo. Piense sobre el hecho de que los experimentos no siempre avanzaron de acuerdo a lo planeado.

21.3 Los genéticos diseccionan la función génica usando genómica y genética reversa

El análisis genético directo empieza con una colección de mutantes y progresa para definir rutas genéticas, clonar el gen silvestre y analizar las funciones bioquímicas del producto génico. Aunque esta aproximación continua siendo una aproximación potente para diseccionar la función génica, la genómica moderna y la biología molecular están estimulando la genética reversa como la herramienta de disección de elección. Aunque los investigadores debaten si la genética directa se convertirá en obsoleta como herramienta de investigación, muchas tecnologías genómicas y basadas en aspectos moleculares todavía precisan del análisis mutacional de genes candidatos, ya que ésta es la demostración definitiva de la función biológica.

La **genética reversa** es un término amplio que describe diversos métodos de análisis genético que empiezan con la clonación de un gen silvestre o con una proteína purificada y que progresan hacia la mutagénesis específica de sitio y el análisis fenotípico, el orden opuesto al de la genética directa.

Actualmente la genética reversa es especialmente importante, una vez completada la secuenciación del genoma de diversos organismos incluyendo levadura, *Drosophila* y los humanos. Los datos genómicos indican que hay aproximadamente 6.200 genes en levadura, y de 25.000 a 30.000 en los humanos; sin embargo, sólo la mitad de los genes de levadura y menos del 10 por ciento de los genes humanos tienen una función asignada. Ahora los investigadores pueden empezar con la secuencia de un gen nuevo en una base de datos genómicos e investigar la función de ese gen. También pueden analizar amplios patrones genómicos de expresión génica antes de conocer la función de los genes individuales a analizar. En algunos organismos modelo, como levadura y *Drosophila*, los investigadores están delecionando sistemáticamente todos los ORFs del genoma y estudiando los fenotipos resultantes. Estas aproximaciones específicas de gen y de alcance genómico comprenden el campo denominado **genómica funcional**.

La genética reversa está especialmente hecha para identificar los genes de enfermedades humanas. Puesto que no es posible mutagenizar ni aparear humanos en situaciones controladas, para identificar los genes responsables de enfermedades no se puede usar la genética directa clásica. Utilizando técnicas de biología molecular, los genéticos clonan y estudian genes de enfermedades humanas empezando solo con el fenotipo de la enfermedad o, en algunos casos, con una proteína humana purificada. Además, la genómica funcional permite a los investigadores identificar grandes cantidades de genes cuyos niveles de expresión se encuentran modificados en determinados estados enfermizos, y facilitando la identificación de estos genes.

En esta sección se explorará cómo los genéticos usan las aproximaciones de genética reversa para diseccionar la función génica. En la siguiente sección se describirán algunos de los nuevos métodos de la genómica funcional.

Análisis genético a partir de una proteína purificada

Uno de los puntos de partida para el análisis genético reverso es una proteína que se sospecha que está implicada en un fenotipo de interés. Si se puede purificar una cantidad suficiente de la proteína candidata, los genéticos pueden determinar la secuencia aminoacídica de la proteína. Esto se hace cortando secuencialmente los aminoácidos del extremo N-terminal en un secuenciador automático de aminoácidos. Entonces los investigadores examinan la secuencia aminoacídica y deducen la secuencia de DNA del gen que corresponde a la secuencia aminoacídica de la proteína. Puesto que el código del DNA es degenerado, hay diversas secuencias posibles de DNA que podrían ser responsables de codificar una secuencia aminoacídica particular. Por lo tanto, los investigadores sintetizan diversas combinaciones de oligonucleótidos que se corresponderán con todas las combinaciones de codones posibles (Figura 21.12). Entonces marcan la mezcla de oligonucleótidos sintéticos de DNA con radioactividad o con colorantes indicadores, y usan esta mezcla para examinar una biblioteca genómica o de cDNA. Si uno o más oligonucleótidos hibridan con un clon de la biblioteca, se selecciona ese clon para nuevos análisis (Véase la Figura 19.13).

Los investigadores usaron esta primera estrategia basada en proteínas para clonar el gen responsable de la hemofilia A, una enfermedad que provoca defectos en la coagulación sanguínea. A partir de estudios de árboles genealógicos y de ligamiento, los genéticos descubrieron que la hemofilia A es un carácter recesivo ligado a X, probablemente controlado por un solo gen mutado. Una hipótesis razonable era que el responsable de esta enfermedad codificaba un factor de coagulación sanguínea. El análisis bioquímico de los factores de coagulación en la sangre de personas normales y de hemofílicos reveló que una proteína, el Factor VIII, no se encontraba en los hemofílicos. Puesto que el Factor VIII se encuentra en proporciones muy bajas incluso en sangre normal, los investigadores purificaron grandes cantidades a partir de sangre de cerdo. Entonces determinaron la secuencia aminoacídica de una porción de la proteína del Factor VIII y predijeron la secuencia del DNA que codificaría esa proteína. Sintetizaron oligonucleótidos de DNA complementarios a esta secuencia de DNA, examinaron con ella una biblioteca genómica porcina y seleccionaron el gen del Factor VIII de la genoteca. Entonces utilizaron el clon genómico porcino para examinar una biblioteca genómica humana. Comparando las secuencias de DNA del Factor VIII de personas normales y hemofílicas, determinaron que el gen del Factor VIII estaba mutado en las personas hemofílicas, lo que confirmó que este gen es el responsable de esta enfermedad.

Una aproximación alternativa a la clonación de un gen a partir de una proteína purificada implica la utilización de anti-

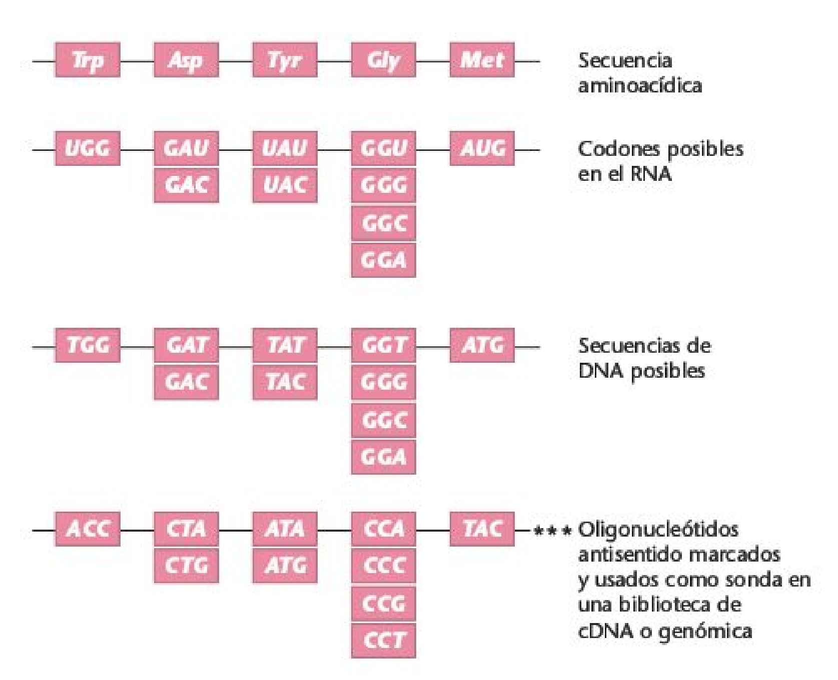


FIGURA 21.12 Estrategia usada para clonar el gen del *Factor VIII* de una biblioteca porcina de cDNA. La proteína purificada del Factor VIII se cortó en péptidos y se determinó la secuencia aminoacídica de cada péptido. Se calcularon todas las posibles combinaciones de codones que podían codificar una determinada secuencia de cinco aminoácidos, y las correspondientes secuencias de DNA. Se sintetizó una mezcla de oligonucleótidos antisentido para cada secuencia posible de DNA que pudiese codificar el péptido de cinco aminoácidos. Esta mezcla se marcó (***) y se usó como sonda en una biblioteca porcina de cDNA para seleccionar el gen del *Factor VIII* porcino. *De Gistchier, J. et al. 1984. Characterization of the human factor VIII gene. Nature 312:326-30. Copyright 1984 Macmillan Publishers Ltd.*

cuerpos. Para generar un anticuerpo contra una proteína purificada, los investigadores inyectan la proteína en animales de laboratorio, como conejos o ratones. Estos animales sintetizarán anticuerpos que reconocen la proteína inyectada, y los anticuerpos se purifican de muestras sanguíneas. Entonces los investigadores usan los anticuerpos purificados como sondas. Primero marcan el anticuerpo con radioactividad o con moléculas fluorescentes, e hibridan el anticuerpo con una biblioteca de cDNA de expresión. Las bibliotecas de expresión contienen clones de cDNA insertados en vectores especiales que contienen un promotor que dirigirá la expresión del cDNA en una célula huésped bacteriana (Figura 21.13). Las colonias de bacterias que contienen clones de cDNA de expresión producirán pequeñas cantidades de las proteínas codificadas por los cDNAs. Los anticuerpos específicos para la proteína purificada reconocerán específicamente la proteína producida en la bacteria a partir del vector de cDNA, permitiendo a los investigadores seleccionar el clon de interés. El gen que codifica la enzima tirosinasa, responsable del albinismo, se clonó de esta manera, usando anticuerpos específicos de tirosinasa.

Análisis genético a partir de un organismo modelo mutante

En algunos casos, es posible clonar un gen por complementación funcional. En la sección anterior se vio que los genéticos usan la complementación funcional en cepas mutantes de levadura para clonar genes de levadura silvestres. La complementación funcional también puede implicar la transformación de un organismo mutante con genes clonados de otro organismo para identificar el gen que controla el fenotipo mutante en ambos organismos.

Un ejemplo de complementación funcional es la utilización de cepas mutantes de levadura para clonar genes homólogos de humanos. Muchos genes y productos génicos se han conservado enormemente durante la evolución, tanto en lo relativo a su secuencia como a sus funciones. Por eso, a veces es posible complementar funcionalmente una mutación de levadura con un gen silvestre humano. Los investigadores han usado esta aproximación para identificar genes humanos que codifican factores de transcripción, enzimas de biosíntesis de purinas y pirimidinas y proteínas de ciclo celular. Una de las primeras complementaciones funcionales exitosas entre genes de levadura y humanos fue la identificación del gen *CDC2* humano. El gen *CDC2* codifica una proteína quinasa que regula diversos estadios del ciclo celular. En 1987, Paul Nurse y sus colaboradores clonaron el gen humano *CDC2* transformando una cepa mutante *cdc2* de levadura sensible a la temperatura con clones procedentes de una biblioteca de cDNA humana. Uno de los clones de cDNA humanos complementó la mutación de levadura, haciendo que esta cepa de levadura volviese al estado silvestre. Recuperaron el plásmido responsable de la comple-

mentación de esa cepa de levadura, lo secuenciaron y descubrieron un 63 por ciento de identidad de secuencia entre las proteínas Cdc2 de levadura y humana. En ambos organismos, el gen CDC2 controla pasos clave del ciclo de división celular.

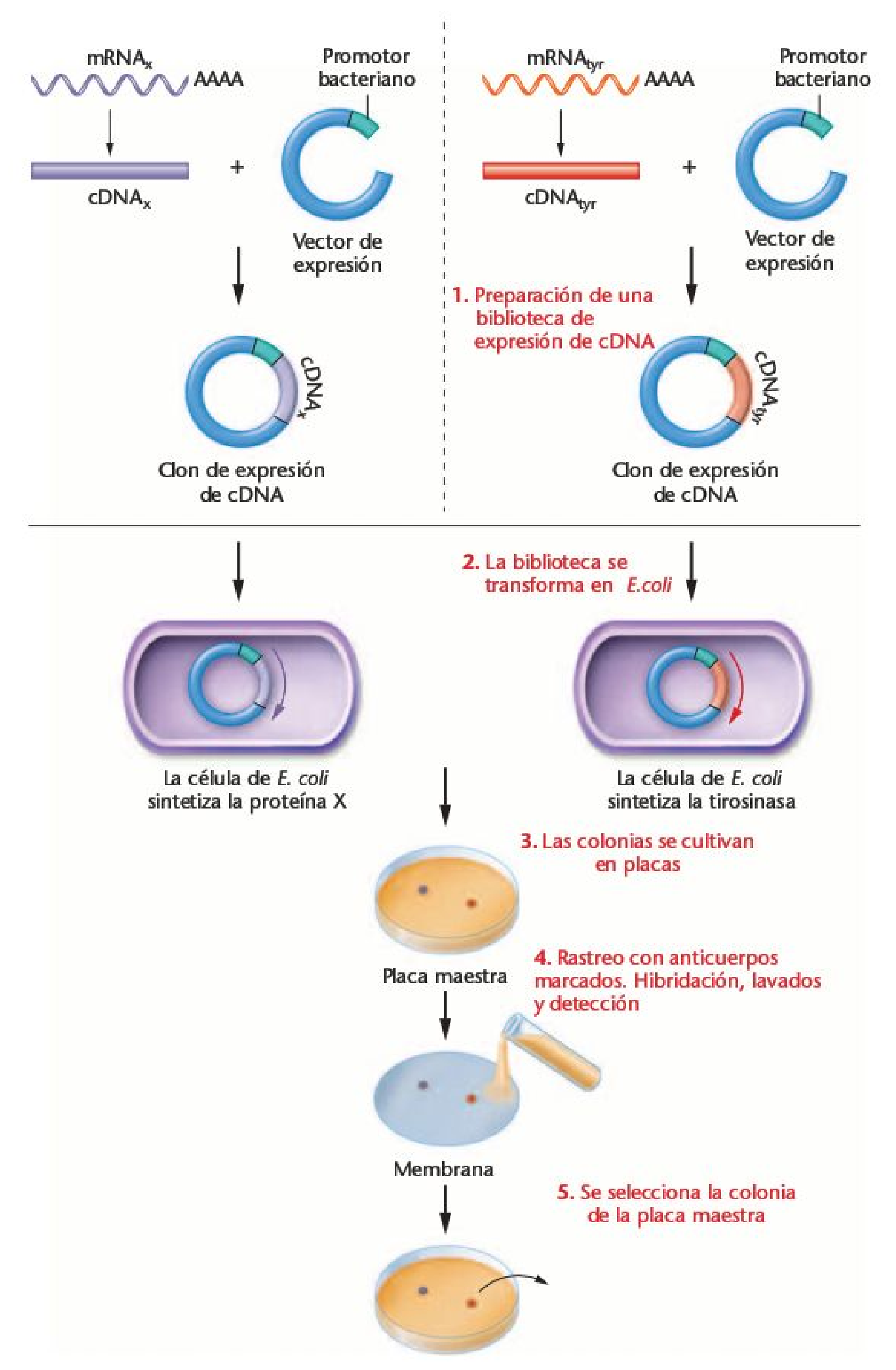


FIGURA 21.13 Clonación del gen de la tirosinasa. Se prepara una biblioteca de cDNA insertando los cDNAs en vectores que contienen un promotor bacteriano. Después de la transformación en células bacterianas, los insertos de cDNA se transcriben y a partir del promotor bacteriano, y los mRNA se traducen en proteínas. Las bacterias que contienen las proteínas se cultivan en placas. Se transfieren células de las colonias a membranas, y la membrana se rastrea con anticuerpos que reconocen la proteína tirosinasa. Las colonias que se unen al anticuerpo se seleccionan de la placa maestra.

Los genéticos también usan complementación funcional en células cultivadas para clonar genes humanos. Por ejemplo, la línea celular EM9 de hámster chico presenta una reparación de DNA defectiva, lo que la hace hipersensible a la radiación ionizante. La complementación funcional de genes humanos silvestres clonados en esta línea celular condujo a la identificación del gen de reparación de DNA humano *XRCC1*. La introducción de *XRCC1* en la línea celular EM9 corrigió la hipersensibilidad de esta línea celular a la radiación ionizante. Además, algunos genes supresores de tumores humanos también se han identificado y clonado transformando genes humanos silvestres en líneas celulares tumorales. Los genes que suprimen el crecimiento de las células tumorales fueron seleccionados, secuenciados y estudiados para verificar sus funciones como supresores de tumores.

Análisis genético a partir de un gen clonado

Una vez se ha identificado un gen candidato, tanto si se ha hecho a partir de análisis mutacional directo, como de una aproximación basada en proteínas, de un ensayo de complementación funcional o simplemente seleccionándolo al azar de una colección de clones, debe someterse a más análisis genéticos y bioquímicos para verificar su función.

A menudo el primer paso que los genéticos usan para caracterizar un gen candidato es comparar la secuencia de DNA del gen con las secuencias disponibles en **bancos de datos de DNA**, como GenBank. Los investigadores emplean programas de comparación de secuencia por ordenador para revelar regiones de similitud de secuencia y para establecer **alineamientos de secuencia** entre el gen candidato y otros genes presentes en la base de datos. Si otro organismo presenta un gen similar, tal vez se conozca su función, lo que proporciona pistas sobre la función del gen candidato. Una vez los investigadores conocen la secuencia de DNA del gen, traducen la secuencia de DNA a la secuencia aminoacídica del producto proteico y comparan esta secuencia aminoacídica con la de otras proteínas, también disponibles en bases de datos de secuencias públicas, como SwissProt. Los investigadores usan programas de ordenador como BLAST para buscar secuencias proteicas para regiones con similitud para conocer motivos aminoacídicos en otras proteínas. Si la proteína candidata contiene un motivo como una región de unión a DNA, una región quinasa, un motivo transmembrana o una señal de secreción, éste puede sugerir las funciones de la proteína. Entonces se pueden analizar estas funciones putativas mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular.

Una segunda aproximación que contribuye a la determinación de la función de un gen candidato es el análisis de los patrones de **expresión génica**. Los investigadores pueden determinar los patrones de expresión génica temporal y tisular específicos usando diversas técnicas. Una **hibridación *in situ*** de RNA puede revelar la presencia del mRNA en uno o más tejidos en un organismo pluricelular, o en una o más estructuras en una única célula (Figura 21.14). Para realizar una hibridación *in situ*, los investigadores marcan un clon de cDNA con un marcador fluorescente o visible, y luego hibridan la sonda marcada con una sección fina del tejido[2]. Tras lavar la sonda no hibridada, observan la sección en un microscopio de transmisión o de fluorescencia. La presencia de colorante define dónde se expresa el gen a nivel de su mRNA, y puede sugerir su función. Por ejemplo, si el mRNA sólo se encuentra en el hígado de los embriones de ratón, el gen puede desempeñar una función esencial en el desarrollo inicial del hígado[3]. Alternativamente, si el mRNA está presente en todas las células en todos los estadios de desarrollo, el gen podría codificar una proteína ubicua de funcionamiento celular.

Otra manera para determinar el momento y el lugar de la expresión de un gen es realizar un análisis de transferencia *northern* (descrita en el Capítulo 19). Esta técnica implica purificar mRNA a partir del tejido de interés, someterlo a electroforesis, transferir el mRNA separado a un filtro e hibridar el filtro con una sonda de DNA marcada (Figura 21.15). Las transferencias *northern* pueden ser más laboriosas que las hibridaciones *in situ*, pero son más útiles para cuantificar el mRNA.

Aunque a menudo la presencia de mRNA refleja la expresión tisular y temporal del gen candidato, el patrón de expresión de la proteína puede ser más relevante, especialmente si la regulación del gen ocurre en estadios postranscripcionales. Si la regulación de la expresión del gen candidato se produce a nivel de la traducción o de la estabilidad de la proteína, puede que los perfiles proteicos y de mRNA no sean idénticos[4]. Para verificar la expresión tisular y temporal de la proteína, los investigadores analizan el perfil de expresión proteica mediante **tinción inmunofluorescente**. La tinción inmunofluorescente utiliza un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de interés. Para realizar la tinción, los anticuerpos pueden estar directamente marcados con el marcador fluorescente, o se unen a un anticuerpo secundario que reconoce el primer anticuerpo. El anticuerpo secundario está conjugado al marcador fluorescente. Como en la hibridación in situ, la sonda marcada se hibrida con una sección fina de tejido, se elimina el exceso de anticuerpo y la sección se observa usando un microscopio de fluorescencia (Figura 21.16).

---

[2] *Nota del traductor:* las sondas también pueden ser de RNA, marcadas de la misma manera.

[3] *Nota del traductor:* en el caso de embriones suficientemente pequeños, éstos se pueden hibridar directamente con la sonda sin necesidad de obtener secciones finas (véase la Figura 12.14).

[4] *Nota del traductor:* esto es especialmente evidente en las proteínas secretadas, que pueden ejercer su función a cierta distancia de las células que las han producido y que, por consiguiente, son las que expresan el mRNA correspondiente.



FIGURA 21.14 Hibridación *in situ* de embriones de ratón enteros, que muestra la distribución del mRNA de *Hoxc11* durante el desarrollo. El RNA se detecta como una tinción de color azul oscuro, cerca de la parte posterior del embrión. La cabeza del embrión está a la izquierda; la cola a la derecha. Embriones de ratón a 10,5 (A), 11,5 (B) y 12,5 (C) días de gestación, que muestran el mRNA de *Hoxc11* concentrado en las extremidades anteriores, en las vértebras y en las células que posteriormente formarán los riñones y los órganos reproductores. Estos datos sugieren que el producto génico de *Hoxc11* está implicado en el desarrollo inicial de estas estructuras.

A menudo la búsqueda de la función del gen candidato implica un gran número de ensayos bioquímicos y de biología molecular, cuya descripción escapa al propósito de este capítulo. Por ejemplo, si se sospecha que el gen codifica una proteína quinasa, los investigadores pueden analizar la capacidad del producto génico purificado de fosforilar diversos substratos *in vitro*. También pueden examinar las interacciones del producto génico con otras proteínas celulares precipitando complejos específicos de células vivas e identificando las proteínas de los complejos. Si se sospecha que el producto génico es un factor de transcripción u otra proteína de unión a DNA, existen herramientas que permiten a los investigadores identificar las secuencias de DNA que se unen a esos factores, y

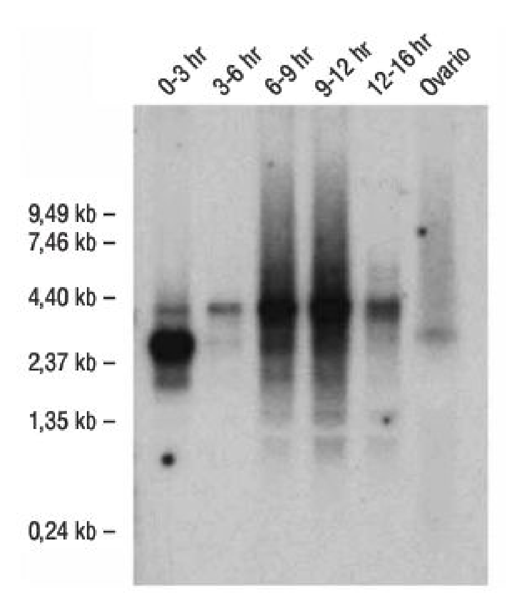


FIGURA 21.15 Análisis por transferencia *northern* de la expresión del gen *dfmr1* en ovarios y en embriones de *Drosophila*. En los ovarios y en los embriones de 0 a 3 hr hay un transcrito de *dfmr1* de 2,8 kilobases (kb). La transcripción de *dfmr1* presenta un pico entre las 9 y las 12 hrs de desarrollo, y mide 4,0 kb. Estos datos sugieren que la expresión del gen *dfmr1* puede estar regulada a nivel de la transcripción o a nivel del procesamiento del transcrito durante la embriogénesis. El gen *dfmr1* es homólogo del gen *FMR1* humano. Las mutaciones de pérdida de función de *FMR1* resultan en retraso mental debido a X frágil.

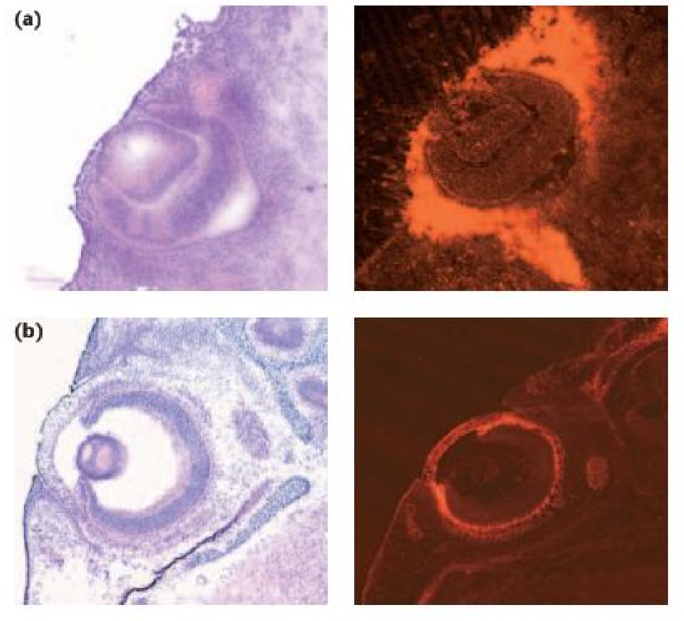


FIGURA 21.16 Tinción inmunofluorescente del ojo de ratón en desarrollo, que muestra la localización de la proteína Pitx2. Los dos paneles de la izquierda muestran ojos embrionarios de ratón teñidos con un colorante específico de DNA que marca el núcleo de todas las células. Los dos paneles de la derecha son las correspondientes muestras teñidas con inmunofluorescencia, vistas con un microscopio de fluorescencia. Los estadios embrionarios son 11,5 días (a) y 15,5 días (b). El patrón de expresión de la proteína Pitx2 es congruente con la función propuesta la el gen de Pitx2 en el desarrollo inicial del ojo. C, córnea; i, iris; pm, mesénquima periocular.

en última instancia los genes que controlan (como se describe en la Sección 21.4).

Análisis genético utilizando tecnologías de domiciliación génica

El análisis definitivo de la función génica proviene del estudio *in vivo* de los fenotipos de los organismos mutantes. En la aproximación de la genética reversa, la generación de mutantes sigue al aislamiento del gen. Además, el tipo de mutación se encuentra bajo el control preciso del investigador. Los investigadores pueden hacer mutaciones específicas en el gen candidato clonado, introducir el gen mutado en un organismo modelo y examinar el fenotipo. Los genes específicos se pueden alterar, delecionar y mover de un organismo a otro.

Dos de las potentes técnicas que los genéticos emplean para entender la función génica son los *knockout* y los reemplazos génicos que siguen a la mutagénesis específica de sitio, que en conjunto se denominan domiciliación génica.

La domiciliación de *knockouts* génicos implica la deleción o la alteración de un gen específico. Esto se puede hacer en muchos organismos modelo, incluyendo levadura, *Drosophila* y ratón. En levadura, el reemplazo génico es especialmente eficiente debido a los altos niveles de **recombinación mitótica** en este organismo. En la Figura 21.17 se ilustra uno de estos métodos. En este ejemplo, los investigadores insertan el gen *KanMX* (que confiere resistencia al antibiótico G418) en medio del gen clonado de interés, reemplazando una porción del gen. Este reemplazo mantiene las secuencias génicas a ambos lados del gen *KanMX*, que son idénticas a las del gen de interés. Se transforman secuencias lineales de DNA que contienen el gen *KanMX* y las secuencias flanqueantes en células diploides de levadura. Los fragmentos de DNA experimentan recombinación homóloga con el cromosoma de levadura, reemplazando el gen silvestre con el casete *KanMX*. Las células experimentan esporulación, se hace crecer a las esporas en presencia de G418, y se seleccionan las supervivientes. En las levaduras haploides resultantes, estas células resistentes a G418 serán nulas para el gen de interés.

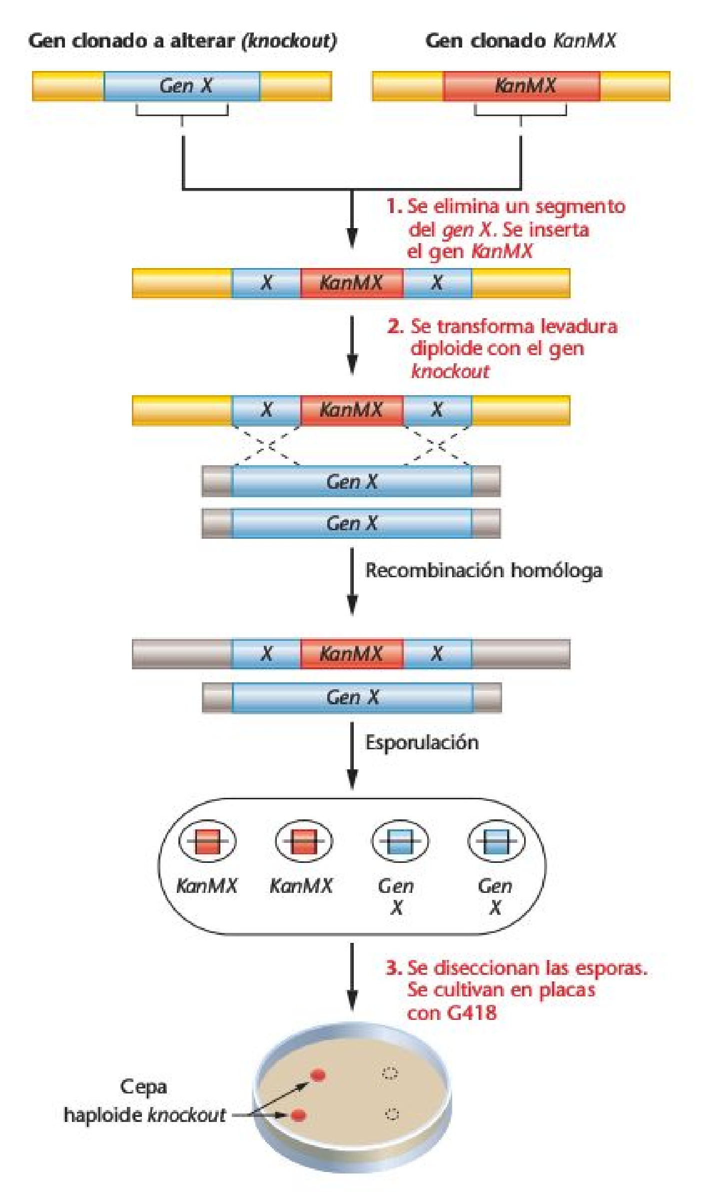


FIGURA 21.17 Domiciliación génica *knockout* en levadura. El gen *KanMX* se inserta en una copia clonada del gen a alterar (Gen X). Se transforma el *gen X* alterado por *KanMX* en células diploides de levadura. Se produce recombinación homóloga entre el gen clonado *knockout* y un cromosoma de la célula de levadura diploide, generando una cepa de levadura *knockout* heterocigota. Tras la esporulación, las cuatro esporas haploides se diseccionan del asco y se cultivan en placas que contienen medio de cultivo y el antibiótico G418. Cualquier espora que crezca contiene el *gen X* alterado por *KanMX*.

En los ratones, el diseño de los *knockout* génicos es más complicado (Figura 21.18). El primer requisito es disponer de un cultivo de **células cepa embrionarias** (**ES**, del inglés *embryonic stem cells*). Las células ES se obtienen de embriones iniciales de ratón en estadio de blastocisto y se cultivan en un cultivo tisular. Bajo condiciones adecuadas, estas células crecerán y se dividirán como células individuales sin diferenciarse. El segundo requisito es disponer de una versión alterada del gen de interés. Los investigadores alteran el gen clonado cortando un trozo de DNA del gen e insertando un gen de resistencia a un antibiótico, como *neo*^{r}. Entonces este fragmento viene a formar parte de una molécula más larga de DNA recombinante que también contiene el gen *tk* del virus del herpes simplex. El gen *neo*^{r} confiere resistencia al antibiótico neomicina. El gen *tk* vírico codifica una enzima, la timidina quinasa, que fosforila selectivamente análogos de nucleósidos como el ganciclovir. Si se hace crecer una célula que exprese el gen *tk* en presencia de ganciclovir, el análogo del nucleósido fosforilado se convierte en un inhibidor tóxico de la replicación del DNA celular. El vector que contiene los genes *neo*^{r} y *tk* se denomina **vector de domiciliación**.

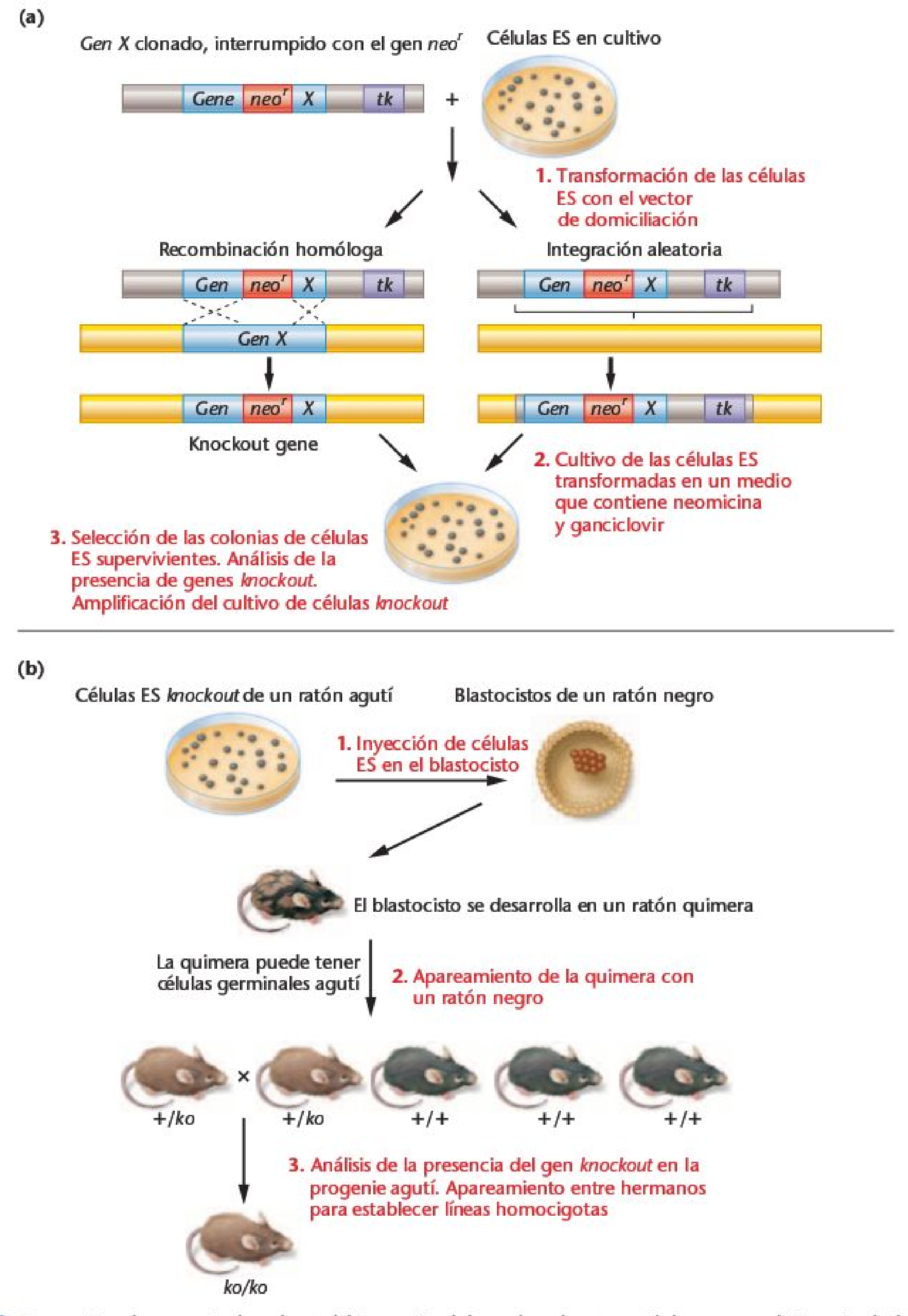


FIGURA 21.18 Generación de un ratón *knockout*. (a) Inserción del gen knockout en células cepa embrionarias (ES). Las células ES proceden de un ratón agutí (marrón). (b) Generación de la cepa *knockout* de ratón a partir de la células ES *knockout*.

Cuando el vector de domiciliación se transforma a células ES en cultivo, se producen dos posibles sucesos de recombinación. Primero, el vector de domiciliación puede experimentar recombinación homóloga con el gen de interés de la célula ES, en las regiones de identidad de secuencia que flanquean el gen *neo*^{r}. Segundo, el vector de domiciliación puede experi-

mentar una integración aleatoria en el genoma de la célula ES. Para seleccionar las células ES que han experimentado recombinación homóloga, los genéticos cultivan las células transformadas en un medio que contiene neomicina y ganciclovir. Las únicas células que sobreviven a la presencia de neomicina son las que han incorporado el vector de domiciliación que contiene el gen *neo*^{r}. La únicas células resistentes a neomicina que sobreviven en presencia de ganciclovir son las han experimentado recombinación homóloga con el vector de domiciliación, y por eso no han incorporado el gen *tk*. Tras esta selección química, se analizan las células ES supervivientes por transferencia de Southern o por PCR para verificar que el gen de interés de la célula ES ha sido alterado por el DNA del vector de domiciliación.

Una vez las células ES con la alteración domiciliada están listas, se usan para generar un ratón *knockout*. Los investigadores obtienen blastocistos de un ratón cuyo color del pelaje sea diferente del que suministró las células ES. Por ejemplo, si las células ES provienen de un ratón con un color de pelo dominante marrón (agutí), el blastocisto puede haber sido donado por un ratón con pelo negro recesivo. Las células ES se inyectan en el blastocisto, y se convierten en parte del embrión en crecimiento, incluyendo a veces la línea germinal. El ratón resultante será una quimera, ya que procede de dos fuentes distintas de células. Es fácil identificar los ratones quimera, ya que su pelo presenta manchas marrones y negras. Entonces los ratones quimera se aparean con ratones negros. Si el gen *knockout* se encuentra en la línea germinal de un ratón quimera, la mitad de su progenie será heterocigota para el color agutí y también para el gen *knockout*. Tras analizar el DNA de la progenie del ratón quimera, la progenie que contiene el gen *knockout* se aparea para establecer ratones *knockout* homocigotos[5].

Este elaborado procedimiento se usa para establecer ratones *knockout* como modelos de enfermedades humanas, así como también vehículos para analizar la función de los genes clonados. Por ejemplo, esta aproximación se usó para verificar qué mutaciones en el gen *CFTR* son responsables de la fibrosis quística, una enfermedad.

El reemplazo génico domiciliado es una herramienta igualmente valiosa para diseccionar la función de un gen clonado. Normalmente el reemplazo génico implica la substitución de la versión silvestre del gen de interés por un gen que contiene mutaciones específicamente diseñadas. Pero, ¿cómo introducen los genéticos mutaciones específicas en un gen clonado?

Para hacerlo, realizan mutagénesis específica de sitio. La mutagénesis específica de sitio permite a los investigadores introducir mutaciones específicas en sitios precisos en un gen clonado. Los genéticos usan mutagénesis específica de sitio para delecionar, insertar o cambiar uno o más nucleótidos en un clon de DNA. Esta técnica fue desarrollada inicialmente durante la década de 1980 por Michael Smith en la University of British Columbia. El Dr. Smith recibió el premio Nobel de química en 1993, lo que refleja la importancia de esta técnica para el análisis genético moderno. Actualmente existen diversas variantes de esta técnica de mutagénesis específica de sitio, incluyendo las basadas en la utilización de la PCR. Aquí se discutirá el método clásico de mutagénesis específica de sitio basado en la técnica del Dr. Smith.

El primer paso en el método clásico de mutagénesis específica de sitio es clonar el gen de interés y determinar su secuencia de DNA. Se examina la secuencia de DNA, y se elige el sitio de la mutación y su naturaleza (Figura 21.19). El gen, o un fragmento del gen, se clona en el bacteriófago M13 (descrito en el Capítulo 19). M13 existe en dos formas: la forma de DNA de doble cadena conocida como forma replicativa, y la forma de DNA de cadena sencilla que es expulsada de la célula bacteriana. Una vez se ha clonado el gen de interés en M13, se cultiva la forma de cadena sencilla del genoma de M13 y se usa *in vitro* como molde sobre el que generar la mutación específica de sitio.

El segundo paso en la mutagénesis específica de sitio es diseñar y sintetizar un oligonucleótido que sea complementario a la región del gen de interés, pero que contenga la mutación deseada. Los oligonucleótidos pueden ser de solo 18 nucleótidos. La mutación puede ser un cambio en uno o en más nucleótidos, o una pequeña deleción o inserción. Entonces se hibrida el oligonucleótido sintético a la cadena sencilla de la molécula de DNA de M13, de manera que se une a la región de complementariedad entre el oligonucleótido y el gen clonado en M13. La región que no es complementaria (i.e. la mutación) no hibrida con el gen de interés en el clon de M13 de cadena sencilla. Se añade una polimerasa purificada a esta reacción, junto con una mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP). La polimerasa de DNA extiende el extremo 3' del oligonucleótido para generar una molécula de DNA de M13 de doble cadena. Se añade DNA ligasa para sellar la cadena de DNA recién sintetizada. Entonces se transforma la molécula de M13 de doble cadena en bacterias *E. coli*. La bacteria replica el DNA de M13 de doble cadena. Puesto que la replicación del DNA es semiconservativa, la mitad de las moléculas de DNA replicadas contendrán la mutación, y la otra mitad llevarán la versión silvestre del gen clonado. Entonces se seleccionan las versiones mutadas de las moléculas de M13 usando diversos procedimientos de rastreo molecular.

Tras sintetizar la versión mutada del gen, ésta se puede subclonar a partir del vector M13 en distintos vectores diferentes, y se puede introducir en células en cultivo o en organismos modelo para ensayar la función del gen mutante. Los genéticos pueden introducir genes recién mutados en organismos usando las tecnologías de transgénesis. Si el organismo es

[5] *Nota del traductor:* otra técnica de domiciliación génica en ratones implica la microinyección de la construcción deseada en el pronúcleo masculino justo después de la fecundación. En este caso, los ratones resultantes no son quimera, sino directamente heterocigotos para la construcción de interés.

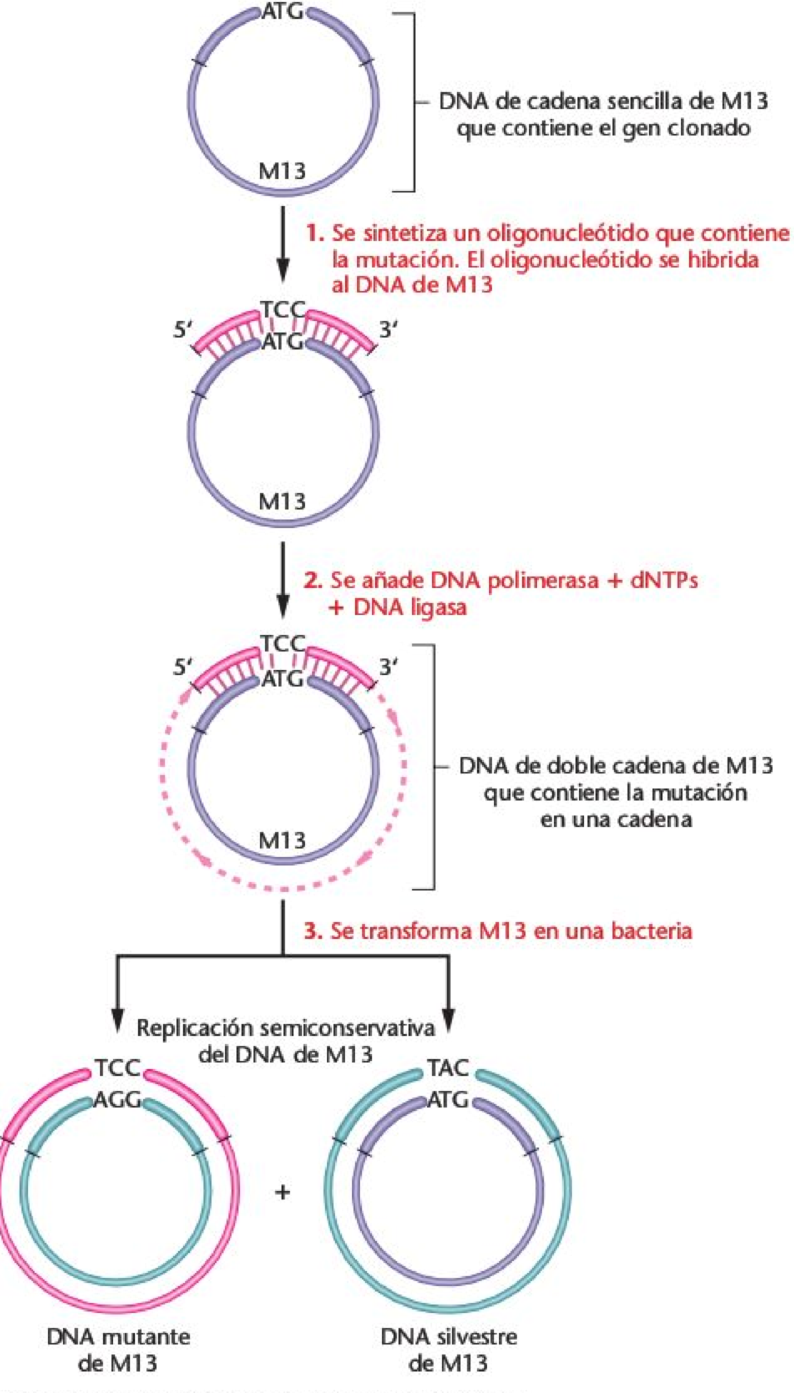


FIGURA 21.19 Mutagénesis específica de sitio mediada por oligonucleótidos.

nulo para el gen de interés, el trasngén proporcionará la única copia del gen, y se podrá valorar su fenotipo. Esta es la estrategia que se está actualizando actualmente para investigar las mutaciones en el gen *CFTR*, responsable de la enfermedad de la fibrosis quística. Los genes *CFTR* mutados se han introducido en modelos de ratón *knockout* para este gen, para determinar cómo controla cada mutación la gama de síntomas que ocurren en la fibrosis quística.

A veces es deseable reemplazar directamente un gen endógeno en el organismo modelo con una copia mutagenizada específica de sitio. Esto se hace en levadura y ratón siguiendo procedimientos similares a los usados para generar *knockout* génicos en estos organismos. En vez de reemplazar el gen silvestre con un gen nulo que contiene un gen de resistencia a antibiótico, el gen silvestre es reemplazado por la copia mutagenizada *in vitro*.

¿Cómo lo sabemos?

¿Cómo sabemos que mutaciones presentes en el gen *CFTR* son responsables para la enfermedad humana de la fibrosis quística?

21.4 Los genéticos diseccionan la función génica usando tecnologías de genómica funcional y de RNAi

Tanto las técnicas de genética directa como las de genética reversa se centran en la generación, la recuperación y el análisis de mutaciones génicas. Sin embargo, estos últimos años los genéticos han diseñado aproximaciones alternativas para la disección genética. Estos métodos no precisan necesariamente la utilización de mutantes, pero implican una inactivación no genética de las funciones génicas y diversas tecnologías de análisis de gran cantidad de datos que permiten el examen simultáneo de un gran número de genes. En esta sección se introducirán diversas de estas nuevas tecnologías, incluyendo RNAi y métodos de genómica funcional de gran cantidad de datos.

RNAi: genética sin mutaciones

Tanto los análisis de genética directa como de genética reversa se centran en la generación y el examen de genes mutantes. Estas aproximaciones, aunque muy efectivas, son laboriosas y no se pueden utilizar en organismos en los que la domiciliación génica no es posible. Recientemente, los investigadores han diseñado una nueva y potencialmente potente herramienta de disección, la **interferencia del RNA (RNAi)**. Esta nueva tecnología permite a los investigadores generar específicamente defectos en un solo gen sin recurrir a la generación de mutaciones hereditarias. Estas tecnologías de **silenciamiento génico** mediado por RNAi son relativamente económicas y permiten el análisis rápido de la función génica. Los investigadores esperan usar la tecnología de RNA para inhibir sistemáticamente la función de todos los genes en los organismos modelo. Esta técnica también puede ser útil para la terapia génica, en la que se pueden silenciar genes específicos responsables de enfermedades.

En la naturaleza, las células emplean RNAi para defenderse de virus y de transposones invasores. (Véase el Capítulo 17.) Las moléculas de RNA de doble cadena producidas por estos agentes son reconocidas por enzimas de la célula que degradan los RNAs de doble cadena. Cuando se degrada el RNA, no se traduce ninguna proteína y se bloquea la expresión génica. Otra forma de actuación del RNAi es inhibiendo la transcripción de genes de transposones víricos. En este caso, las cadenas antisentido de las moléculas de RNA de doble cadena se unen a regiones complementarias del gen, lo que conduce al reclutamiento de proteínas que modifican el DNA e inhiben la transcripción. Las células también usan RNAi para regular la expresión de sus genes endógenos. Fragmentos cortos de RNA antisentido complementarios a un mRNA con sentido se pueden unir a este mRNA e inhibir su traducción.

Para utilizar RNAi como una herramienta de investigación, los investigadores introducen moléculas sintéticas cortas de RNA de doble cadena en las células (Figura 21.20). Estas mo-

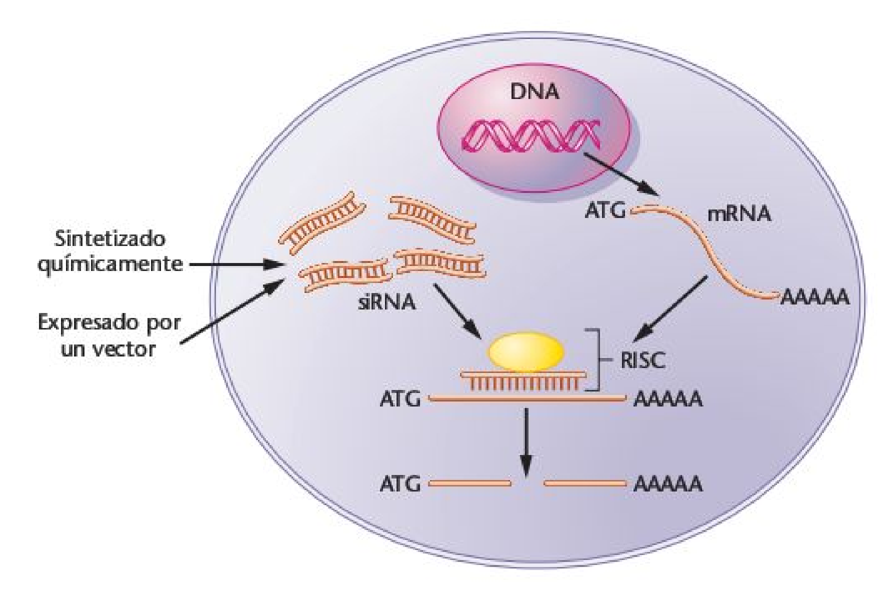


FIGURA 21.20 Interferencia del RNA (RNAi). Se introducen en una célula moléculas cortas de RNA de doble cadena denominadas RNAs de interferencia cortos (siRNAs). En la célula forman parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). La cadena antisentido del siRNA se une al mRNA complementario de la célula, señalando el mRNA celular para que las enzimas de RISC lo corten. Posteriormente el mRNA cortado se degrada, y no se traduce.

léculas estimulan la misma ruta de degradación del RNA que es disparada por RNAs de doble cadena víricos o de transposones. La cadena antisentido del RNA de doble cadena hibrida con el mRNA complementario en las células, señalando el mRNA para que sea degradado.

Alternativamente, los investigadores pueden transformar células con vectores que expresan estructuras de RNA en horquilla que son parcialmente de doble cadena. Si los vectores que expresan la molécula de RNA de doble cadena se integran en el genoma de la célula, toda la progenie de esa célula expresará las moléculas de RNAi, y en ellas se silenciará un gen específico. El silenciamiento puede ser consecuencia de la degradación del RNA o de la inhibición de la transcripción o de la traducción. Otra variación de la técnica de RNAi es controlar la expresión del gen de RNAi con un promotor inducible. Por ejemplo, si se clona el promotor de un gen de choque térmico de *Drosophila* al lado de un gen que codifica el RNAi, y luego se transforma el vector de RNAi en *Drosophila* mediante una transformación mediada por un elemento P, a las moscas resultantes se les podrá activar el silenciamiento génico sencillamente subiendo la temperatura. Esta aproximación es especialmente útil para silenciar genes que son esenciales para la viabilidad durante el desarrollo.

Los métodos de RNAi se han usado con éxito para investigar las funciones génicas en organismos que normalmente son difíciles de manipular genéticamente. Entre ellos se incluyen mosquitos, tripanosomas y células de mamífero. El RNAi también se ha usado para silenciar la expresión de genes que se expresan de forma aberrante en células cancerosas. Cuando se silencian estos genes relacionados con el cáncer, las células cancerosas pierden su capacidad de formar tumores cuando se introducen en ratones. Aunque las tecnologías del RNAi, que a veces se denominan «genética sin mutaciones» sólo se están empezando a desarrollar, son muy prometedoras tanto para investigación como para usos terapéuticos.

Técnicas de genómica funcional de gran cantidad de datos

La principal robustez del análisis genético clásico es que los investigadores pueden examinar los efectos que se producen al alterar un gen cada vez respecto a un fondo de función génica normal en el resto del genoma. Sin embargo, desde el advenimiento de la genómica moderna, se han desarrollado diversas **tecnologías de gran cantidad de datos** que permiten a los investigadores analizar las interacciones genéticas de miles de genes simultáneamente. Estas tecnologías incluyen de DNA y de expresión proteica, métodos automatizados para el aislamiento y la disección de grandes complejos proteicos y búsquedas de alcance genómico de sitios de interacción proteína-DNA. En el Capítulo 20 se discutió la proteómica, el estudio de patrones globales de expresión proteica. Puesto que estas técnicas se basan en la abundancia de datos proporcionados por la terminación de los proyectos de secuenciación del genoma, a menudo se denominan técnicas de genómica funcional.

Estos métodos proporcionan una imagen más global de la expresión génica que la mostrada por los análisis genéticos convencionales, y pueden ayudar a diseccionar aspectos de rutas genéticas y de interacciones génicas que la aproximación mutacional puede pasar por alto.

Microordenaciones de expresión génica

Las microordenaciones de DNA (chips de DNA) se usan para examinar la expresión de miles de genes simultáneamente. Las microordenaciones de DNA son simplemente trozos de vidrio (chips) sobre los que se aplican muestras de DNA siguiendo un patrón ordenado, es decir, una ordenación. (Véase el Capítulo 22.) A menudo estas microordenaciones son producidas por máquinas automáticas que ponen gotas microscópicas de muestras específicas de DNA en posiciones específicas del chip. Las muestras de DNA que se pueden aplicar pueden ser cualquier tipo de DNA clonado, pero a menudo son oligonucleótidos cortos sintetizados *in vitro*. En una microordenación de DNA se pueden aplicar más de 30.000 muestras diferentes, lo que representa miles de genes distintos. Teóricamente, todos los genes del genoma de un organismo pueden estar presentes en una microordenación, lo que permite el análisis de la expresión génica de todo el genoma.

Las microordenaciones de DNA se pueden usar para comparar los patrones de expresión génica en dos o más tejidos diferentes, en un mismo tejido en dos momentos diferentes del desarrollo, o en células normales respecto enfermas.

Cartografía de alcance genómico de sitios de unión proteína-DNA

Hay otra técnica de genómica funcional que está diseñada para cartografiar interacciones proteína-DNA, que es especialmente útil para identificar genes que son regulados por factores de transcripción que se unen al DNA. Para realizar esta técnica, los investigadores tratan tejidos o células aisladas con formaldehído (Figura 21.21). El formaldehído fijará al DNA todas las proteínas que están estrechamente unidas a él. Entonces los investigadores extraen el DNA de las células y lo cortan en fragmentos pequeños. Para aislar los fragmentos de DNA que están unidos a proteínas específicas, añaden un anticuerpo que reconozca la proteína. Entonces se precipita el anticuerpo de la mezcla, junto con la proteína que reconoce y cualquier fragmento de DNA que está fijado a ella. Después los investigadores purifican los fragmentos de DNA inmunoprecipitados, los amplifican por PCR y los marcan con un marcador fluorescente. Los fragmentos de DNA marcados se hibridan con una microordenación de DNA que contenga DNAs clonados que representen todo el genoma del organismo. Cualquier mancha de la microordenación que hibride con el DNA marcado representa una secuencia de DNA que se une a la proteína.

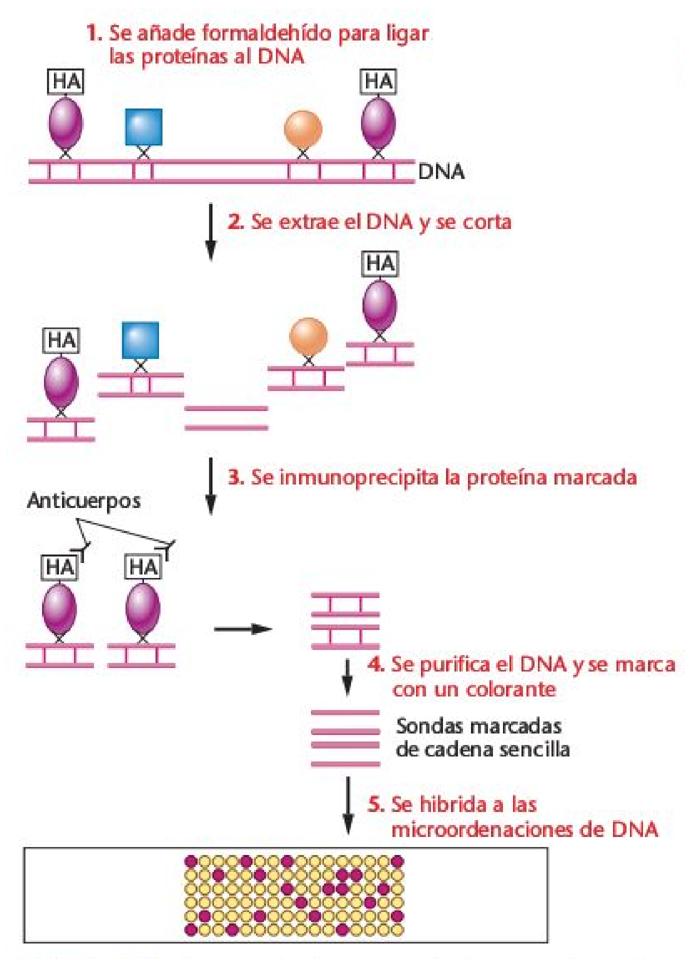


FIGURA 21.21 Rastreo de alcance genómico para sitios de unión de factores de transcripción. La línea superior muestra diversas proteínas unidas a sus sitios de unión en el DNA. Una proteína se marca con un fragmento de otra proteína (HA) que puede ser reconocida por un anticuerpo específico. Se añade formaldehído a los tejidos o a las células en cultivo para ligar estas proteínas al DNA. Entonces se extrae el DNA de las células, y se corta en fragmentos pequeños. Se añade el anticuerpo que reconoce la proteína marcadora a la mezcla, y se retira la proteína /fragmento de DNA de la muestra (inmunoprecipitación). Se purifica el DNA y se marca con un colorante fluorescente. Entonces se hibrida el DNA marcado a una microordenación de DNA. Una señal positiva de hibridación indica una secuencia de DNA a la que se une la proteína marcada con HA. *Reproducido con permiso de Nature Reviews Genetics 2(4):302-312, copyright 2001 Macmillan Publishers Ltd.*

Como se conoce cada mancha de la microordenación, se puede determinar la identidad de cada señal positiva. En una aplicación de este método de alcance genómico se identificaron más de 200 dianas previamente desconocidas de una proteína activadora de la transcripción que funciona en la interfase G1/S del ciclo celular.



El Problema 21.15 de la página 640 le pide que sea crítico con las limitaciones de uno de estos nuevos métodos de genómica funcional de gran cantidad de datos, las microordenaciones de DNA (chips de DNA9, y sobre como superarlas.

Sugerencia: Cuando piense en las limitaciones, podría considerar los problemas técnicos potenciales debidos a la naturaleza del material sobre los chips. También podría pensar en la interpretación de los datos que se obtienen en este tipo de experimentos. Piense también en el número de pasos implicados y en qué puede fallar en cada paso.

21.5 Los genéticos hacen progresar los conocimientos de los procesos moleculares realizando investigación genética en organismos modelo: tres casos a estudio

En este capítulo se han resumido muchas aproximaciones distintas a la disección genética, desde la genética directa y la reversa hasta las técnicas de genómica funcional de gran cantidad de datos. La potencia de estos métodos depende de que se apliquen a sistemas modelo adecuados. Por ejemplo, los genéticos han revelado los mecanismos moleculares básicos de replicación, recombinación, transcripción y traducción del DNA manipulando mutaciones génicas en el procariota unicelular *E. coli*. De forma parecida, algunas de las ideas más importantes sobre el control del ciclo celular y la expresión génica han surgido del análisis de la función génica del eucariota unicelular *S. cerevisiae*. La mutagénesis y los *knockout* génicos en la planta sencilla *Arabidopsis thaliana* están incrementando el conocimiento sobre la genómica de las plantas, su regulación génica y las interacciones gen-ambiente. La investigación pionera sobre el desarrollo de los organismos pluricelulares fue posible gracias a la aplicación creativa de técnicas genéticas en eucariotas sencillos como *C. elegans* y *Drosophila*.

Los siguientes tres casos ilustran el poder de los análisis genéticos en organismos modelo. También proporcionan una narración de cómo los genéticos realizan sus investigaciones. El conocimiento adquirido sobre el control genético del ciclo celular, del desarrollo y de los genes de las enfermedades humanas tiene grandes implicaciones no sólo para entender el proceso básico de la vida, si no también para diseñar terapias potenciales para detener o curar el cáncer y las enfermedades genéticas humanas.

Levadura: genes de ciclo celular

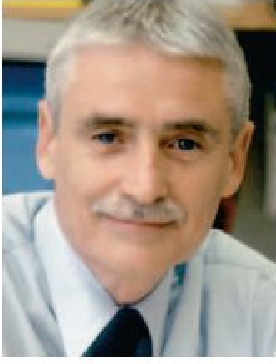
El 8 de octubre de 2001, los Drs. Leland Hartwell, Timothy Hunt y Paul Nurse aceptaron el premio Nobel de fisiología y medicina. Trabajando de manera independiente y utilizando distintos organismos modelo, estos tres investigadores habían hecho importantes descubrimientos sobre los genes que controlan el crecimiento y la división celular (Figura 21.22). Este caso a estudio explica la historia de cómo el Dr. Hartwell y sus colaboradores realizaron una serie de elegantes experimentos usando la levadura *S. cerevisiae*, que se reproduce por gemación. Estos experimentos condujeron a la identificación de docenas de genes que regulan la división celular. Trabajos más recientes revelan que los organismos superiores tienen genes homólogos a éstos, cuyas funciones tienen implicaciones para entender y tratar los cánceres humanos.

Como Hartwell describió en su discurso en el acto de entrega del premio Nobel, empezó su carrera científica interesado en entender el cáncer. Aunque había empezado sus investigaciones estudiando el control de la síntesis de DNA en células de mamífero en cultivo, pronto cambió a *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo. Este organismo tenía varias ventajas importantes para su investigación sobre la división celular. Levadura se puede cultivar fácilmente en el laboratorio como células individuales, y es fácil de manipular genéticamente. Las células de levadura tienen una fase haploide y una fase diploide, lo que permite identificar rápidamente las mutaciones recesivas en el estadio haploide y realizar análisis de complementación en el diploide. Además, Hartwell y sus colaboradores se dieron cuenta de que podrían identificar el estadio del ciclo celular de levadura observando la morfología celular (Figura 21.23). Al inicio de la fase S del ciclo celular, las células de levadura desarrollan una yema (la célula hija) que se extiende a partir de la superficie de la célula madre. Al progresar el ciclo celular, la yema incrementa su tamaño, el núcleo migra a una posición entre las dos células, y tanto el núcleo como las dos células se dividen en dos. Por eso, el tamaño relativo de la yema y de la célula madre, y la morfología nuclear, indican el estadio del ciclo celular. En una población de células de levadura que crecen normalmente, se encuentran células en todos los estadios del ciclo celular.

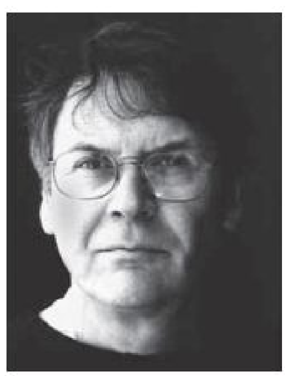
El rastreo genético realizado por Harwell para encontrar mutaciones de ciclo celular empezó tratando un cultivo de levadura con el producto químico mutagénico nitrosoguanidina. Después Hartwell y sus colaboradores sembraron las células en placas de cultivo de manera que cada célula formase una colonia. Una vez se formaron las colonias, hicieron una réplica de las colonias de cada placa en dos placas nuevas, una para ser incubada a temperatura ambiente (23 °C) y la otra a temperatura restrictiva (36 °C). Todas las colonias crecieron a 23 °C, mientras que las colonias de células que habían sufrido una mutación de sensibilidad a temperatura no crecieron a 36 °C (Figura 21.7). Usando esta aproximación, el equipo de Hartwell aisló más de un millar de cepas mutantes con sensibilidad a la temperatura.

Aunque visto en retrospectiva esta investigación sobre la regulación del ciclo celular parece haber seguido una progresión lógica, al principio de su investigación el Dr. Hartwell no tenía ni idea de que algunos de los mutantes de sensibilidad a la temperatura presentaban defectos en el ciclo celular. La primera observación fue que algunos de estos mutantes desarrollaban formas raras a temperatura restrictiva, pero estas células recuperaban la forma normal a temperatura permisiva. Hartwell le pidió a un estudiante de grado, Brian Reid, que determinase cómo cambiaban estas células de la forma rara a la normal. Para hacerlo, Reid decidió utilizar fotografías de lapso de tiempo para examinar las células de levadura a medida que cambiaban de la forma normal a la rara, y de vuelta otra vez a la normal. Puso un microscopio en una habitación a 36 °C, y se pasó el verano fotografiando células de levadura. Al final del proyecto, Reid había descubierto que las células con forma rara se habían detenido en un punto concreto del ciclo celular.

La conclusión de Reid proporcionó las ideas técnicas que permitieron al grupo de Hartwell rastrear los mutantes de sensibilidad a la temperatura buscando defectos del ciclo celular. Observaron todos los mutantes mediante fotomicroscopía de lapso de tiempo tras cambiar las células a 36 °C. Las células de



Leland H. Hartwell
Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA



R. Timothy (Tim) Hunt
Imperial Cancer Research Fund, London, United Kingdom



Sir Paul M. Nurse
Imperial Cancer Research Fund, London, United Kingdom

FIGURA 21.22 Los Drs. Hartwell, Hunt y Nurse, que recibieron el premio Nobel de fisiología y medicina «por sus descubrimientos de reguladores clave del ciclo celular»

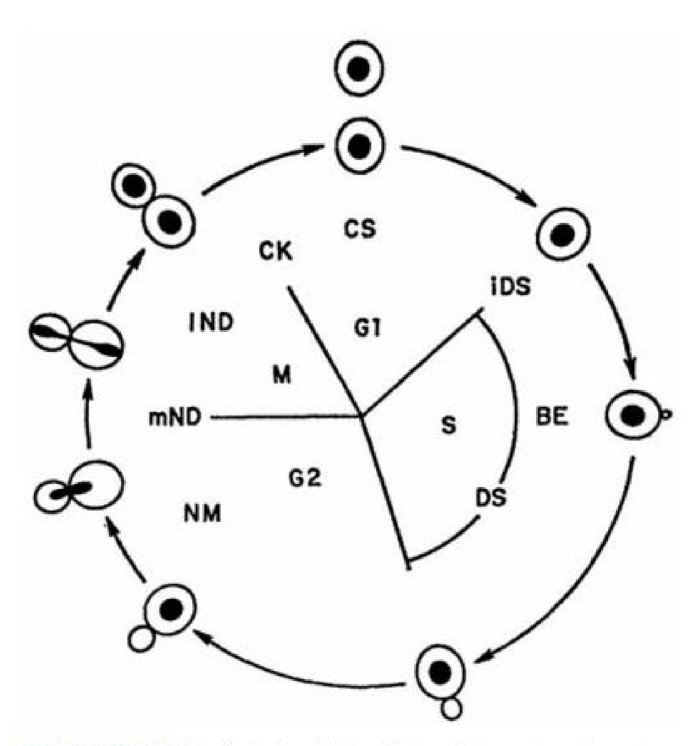


FIGURA 21.23 Morfología de las células de levadura durante el ciclo celular. Diagrama en el que se muestran los estadios del ciclo celular (G1, S, G2 y M) y los pasos del ciclo celular definidos por los mutantes del estudio de Hartwell. iRS, iniciación de la síntesis de DNA; BE, emergencia de la yema; DS, síntesis de DNA; NM, migración nuclear; mND, división nuclear medial; lND, dividión nuclear tardía; CK, citocinesis; CS, separación celular. Esta figura se ha reproducido del artículo de 1974 de *Science* de Hartwell, Culotti, Pringle y Reid, en el que se describe el control genético del ciclo de división celular en levadura.

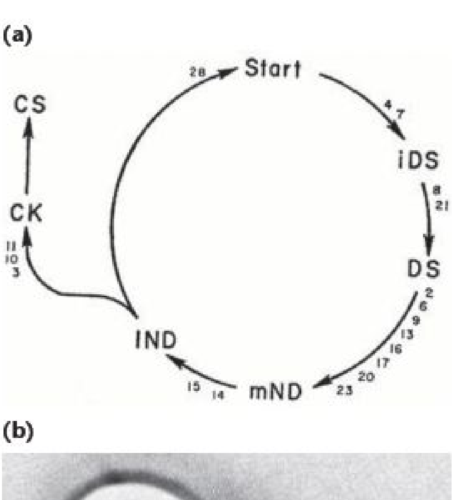
levadura con defectos de sensibilidad a la temperatura en un gen que controlaba un punto del ciclo celular se detenían con un fenotipo uniforme característico de ese punto del ciclo celular (Figura 21.24). Por ejemplo, a 36 °C, todas las células que se detenían en la interfase G2/M parecían tener una gran yema con un núcleo en el istmo entre la célula madre y la hija [Figura 21.24(b)].

Usando estos métodos, los investigadores identificaron unos 150 mutantes de sensibilidad a la temperatura que mostraban defectos en el ciclo de división celular (cdc). La siguiente pregunta fue si las 150 mutaciones se habían producido en genes separados o si unos pocos genes habían mutado múltiples veces. Para hacerlo, los investigadores realizaron un análisis de complementación. Dos cepas de levadura haploides, cada una con una mutación *cdc* sensible a la temperatura, se cruzaban para formar diploides. Si las cepas diploides resultantes eran silvestres, las dos mutaciones se encontraban en genes separados; si las cepas diploides eran mutantes, las dos mutaciones estaban en el mismo gen. De esta manera, determinaron que esas 150 mutaciones *cdc* sensibles a la temperatura se habían producido en 32 genes diferentes.

La siguiente pregunta fue si esos 32 genes regulaban 32 pasos separados del ciclo celular, o si algunos afectaban los mismos pasos. Para ordenar los mutantes, Hartwell y sus colaboradores realizaron un análisis de epistasia. Compararon los fenotipos de ciclo celular de los mutantes sencillos que detiene las células en dos estadios diferentes con los fenotipos de ciclo celular de los mutantes dobles. Cualquier mutante que mostrase epistasis sobre otro mutante representaba una mutación en un estadio anterior del ciclo celular. Usando estos métodos, ordenaron las mutaciones en seis sucesos del ciclo celular, cada uno controlado por uno o más genes [Figura 21.24(a)]. Este análisis también confirmó que cada paso del ciclo celular depende de la realización correcta del paso anterior.

Un mutante particular, *cdc28*, reveló unas características importantes. Los investigadores determinaron que el producto del gen *CDC28* controlaba un paso al final de G1, y la consecución correcta de este paso parecía ser necesaria para todos los siguientes sucesos del ciclo celular. Una vez las células habían

(a)



(b)



FIGURA 21.24 Mutantes de ciclo celular en levadura, ordenados en pasos del ciclo celular. (a) Modelo de Hartwell de los pasos del ciclo celular, con 18 de los mutantes del ciclo de división celular (*cdc*) marcados en el paso afectado en el mutante. Las abreviaciones son las mismas que en la Figura 21.23. (b) Vista microscópica de una célula mutante de levadura, creciendo a temperatura restrictiva. La célula se ha detenido en G2/M con una morfología característica. La imagen (a) es del artículo del Dr. Hartwell de 1974 publicado en *Science* «Genetic control of the cell division cycle in yeast».

superado el paso *CDC28* estaban comprometidas a terminar el ciclo celular antes de que pudiesen detener su crecimiento en respuesta a un ayuno o de que pudiesen aparearse. Hartwell y sus colaboradores llamaron a este punto de decisión «el inicio».

Desde que Hartwell y sus colaboradores publicaron los resultados de su estudio en 1974, la importancia del gen *CDC28* se ha confirmado. Se encuentran homólogos de este gen en virtualmente todos los organismos eucariotas, y las funciones de estos homólogos son similares en todos ellos. El gen *CDC28* de *S. cerevisiae* y el gen homólogo *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe* (una levadura que se reproduce por fisión) se complementan funcionalmente entre sí, como también lo hacen el gen *CDC28* y el gen de *Xenopus laevis* (rana), que codifica el componente quinasa del MPF (el factor de promoción de la maduración). Esta conservación evolutiva de los genes que controlan el ciclo celular se ha usado para identificar y clonar el gen *CDC2* humano mediante la complementación de una cepa mutante *cdc2* de *S. pombe* con una biblioteca de cDNA humana. Actualmente se ha identificado el producto del gen *CDC2/28*, que es una quinasa dependiente de ciclina (CDK). Las CDK controlan el ciclo celular interaccionando con moléculas de ciclina y fosforilando proteínas, de manera que las activan o inactivan. En el Capítulo 18 se describen las precisas y elegantes fosforilaciones cíclicas que orquestan cada estadio del ciclo celular eucariótico. La observación de que el control del ciclo celular es un componente clave de la función celular normal y cancerosa, y de que las CDK son el eje de estas funciones, han validado la elección del Dr. Hartwell de usar levadura como organismo modelo relevante para la investigación del desarrollo del cáncer.

Drosophila: los rastreos de Heidelberg

Cuando los Drs. Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus (Figura 21.25) terminaron su graduado de investigación al final de la década de 1970, decidieron combinar sus fuerzas para realizar una tarea formidable: desentrañar los secretos de cómo una célula huevo unicelular se desarrolla en un organismo pluricelular complejo. Su interés común en el inicio del desarrollo les condujo a su primer puesto de trabajo de investigación independiente en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) en Heidelberg, donde compartieron el mismo pequeño laboratorio de investigación durante tres años. Aunque pensaban, como otros investigadores en este campo, que los genes debían controlar los patrones corporales que surgen durante la embriogénesis, parecía casi imposible determinar qué genes eran los responsables. Se estimó que en un embrión había más de 10.000 productos génicos (RNAs y proteínas), y los niveles relativos de estos productos génicos cambiaban continuamente durante el desarrollo. En este marasmo de regulación molecular fluctuante, ¿cómo podría alguien identificar los genes relevantes?



FIGURA 21.25 Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus.

Los Drs. Nüsslein-Volhard y Wieschaus decidieron sumergirse en la aparentemente imposible tarea de identificar todos los genes que controlan el desarrollo inicial. Ningún científico había realizado una tarea tan ambiciosa y no estaba nada claro que fueran a tener éxito.

Como organismo modelo para sus estudios eligieron la mosca del vinagre *Drosophlia melanogaster*. La célula huevo de *Drosophila* se desarrolla rápidamente, en unas 20 horas desde la fecundación hasta la eclosión de la larva, y unos 9 días hasta la formación de la mosca adulta. Entre la fecundación y la eclosión, una única célula se divide y se diferencia en unas 42.000 células en el momento en que los patrones de segmentos embrionarios están completamente establecidos. Además, la genética de *Drosophila* está bien desarrollada, con métodos establecidos para mutagenizar y mantener cepas mutantes. Los dos investigadores decidieron restringirse a examinar patrones embrionarios iniciales y larvarios y a observar estos patrones en la cutícula de las larvas. Este esqueleto externo proporciona puntos de referencia externos que reflejan el plan corporal subyacente. Esta decisión fue importante ya que les permitió observar características del desarrollo en moscas del vinagre que soportaban mutaciones letales recesivas. Podían observar y registrar los defectos de los embriones y las larvas que estaban destinados a morir antes de que muriesen o justo después de morir.

Sin saber cuántos genes estaban buscando, Nüsslein-Volhard y Wieschaus decidieron establecer un gran número de cepas de moscas mutantes. Puesto que muchas de las mutaciones que generaron serían mutaciones letales recesivas, también tuvieron que diseñar un método que les permitiese mantener estas mutaciones en reservas de moscas heterocigotas, pero generar también moscas mutantes homocigotas en las que pudiesen observar y rastrear los defectos. Para hacerlo, desarrollaron la siguiente estrategia. Primero alimentaron moscas macho con el producto químico mutagénico sulfonato de etilmetano (EMS), que causa una alta frecuencia de mutaciones, especialmente cambios de una sola base. Entonces cruzaron los machos mutagenizados con hembras que llevaban un cromosoma balanceador para el cromosoma que querían rastrear.

La Figura 21.26 muestra esta estrategia para rastrear mutaciones en el segundo cromosoma. El macho es homocigoto recesivo para dos mutaciones (*cn* y *bw*) en el segundo cromosoma, lo que resulta en un fenotipo de ojos blancos. El segundo cromosoma en la cepa balanceadora femenina contiene un gen dominante para alas rizadas (*CyO*) en uno de los homólogos, y un gen letal dominante de sensibilidad a la temperatura (*TS*) en el otro homólogo. En la primera generación se seleccionaron individualmente los machos con ojos rojos y alas rizadas. Estos machos tenían un segundo cromosoma procedente de su progenitor masculino (que probablemente contenía una mutación) y un segundo cromosoma de la hembra balanceadora, que contenía el marcador alas rizadas. Entonces los machos de esta primera generación se retrocruzaron con la misma cepa balanceadora de hembras. La segunda generación se cultivó a temperatura restrictiva, lo que mató todas las moscas que habían heredado el gen *TS* dominante de sensibilidad a la temperatura. Además, todas las moscas que habían heredado del marcador alas rizadas no sobrevivían, ya que el cromosoma *CyO* es letal en homocigosis. Por eso, los únicos descendientes viables en esta segunda generación contenían una copia del cromosoma balanceador *CyO* y una copia del cromosoma mutagenizado que contenía el marcador ojos blancos. Esta segunda generación se cruzó consigo misma para obtener la

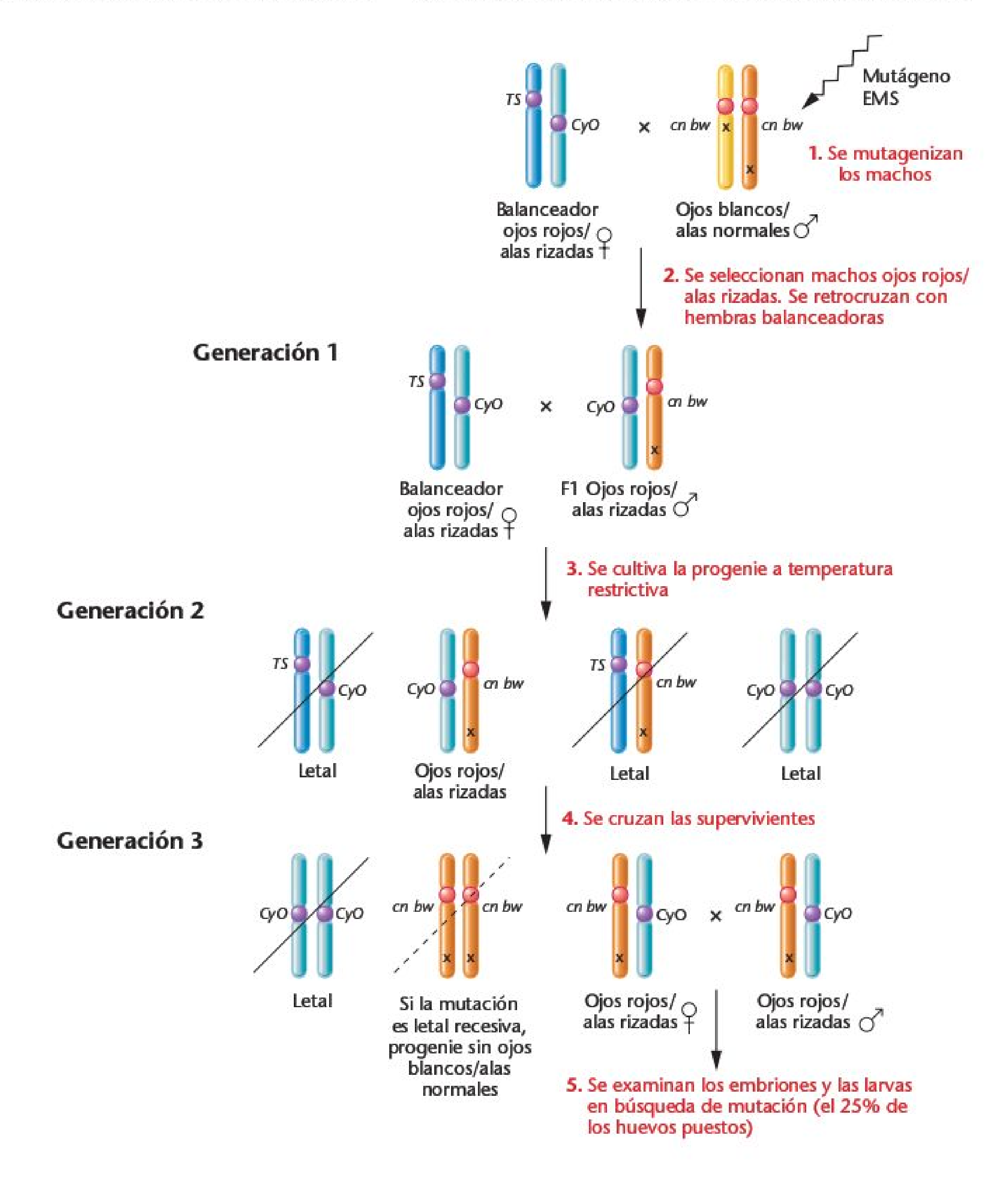


FIGURA 21.26 Estrategia para el rastreo de mutaciones letales recesivas en el segundo cromosoma de *Drosophila*.

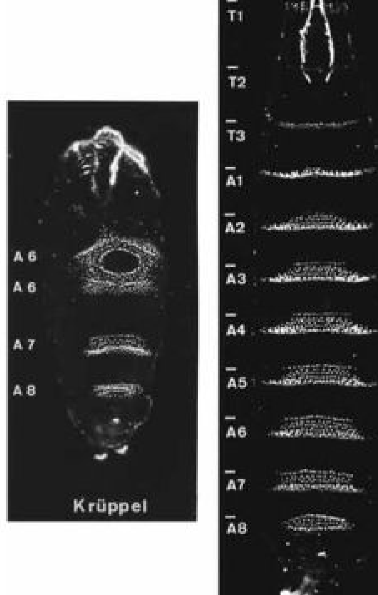
tercera generación. Como los homocigotos *CyO* no eran viables, sólo había tres tipos posibles de descendientes en esta tercera generación. Los investigadores sabían que la progenie que en esta tercera generación mostrase ojos blancos contendría el cromosoma ojos blancos *cn bw* en homocigosis sin ninguna mutación letal recesiva. Sin embargo, si había un alelo letal recesivo presente en el cromosoma marcado con *cn bw*, no habría descendientes con ojos blancos. En este caso la cepa podría mantenerse indefinidamente mediante apareamientos consanguíneos. Los únicos supervivientes en estas reservas balanceadoras serían moscas de ojos rojos y alas rizadas, con el gen letal recesivo en uno de los dos homólogos del segundo cromosoma. Este procedimiento se repitió para todos los cromosomas de *Drosophila* a analizar.

En los rastreos realizados en Heidelberg, Nüsslein-Volhard y Wieschaus examinaron la tercera generación de todas las cepas que no contenían descendientes homocigotos viables (sin moscas de ojos blancos). Entonces rastrearon estas cepas para determinar si la letalidad debida a los cromosomas *cn bw* ocurría al final de la embriogénesis o al inicio de las fases larvarias. Durante más de un año, los dos investigadores trabajaron juntos, utilizando un microscopio para dos personas, examinando miles de embriones tardíos en busca de anomalías en su organización corporal y en su segmentación (Figura 21.27). Entre 1979 y 1980 establecieron unas 27.000 líneas individuales de *Drosophila*. Determinaron que unas 18.000 de esas líneas contenían mutaciones letales recesivas, y que de ellas 4000 eran letales durante la embriogénesis. De estos letales embrionarios, unas 580 líneas mostraban defectos visibles en la cutícula externa. Entonces abordaron la pregunta de cuántos genes estaban representados en estas 580 mutaciones letales embrionarias. Su análisis de complementación reveló que esas 580 mutaciones yacían en sólo 139 genes.

El rastreo de Heidelberg proporcionó varios resultados sorprendentes. Uno fue el bajo número de genes que parecían regular la formación del patrón embrionario, a pesar de la aparente complejidad del proceso. El segundo fue el hecho de que estos genes podían clasificarse en grupos, ya que muchos parecían afectar el mismo paso de desarrollo. Los genes identificados por Nüsslein-Volhard y Wieschaus se podían clasificar en función del momento en que actuaban durante el desarrollo, y también en función de las partes del embrión que esos genes programaban. Por ejemplo, los 30 genes de segmentación se encontraban dentro de tres grupos. Todas las mutaciones en los genes *gap* (que generan huecos, como *Krüppel* y *knirps*) muestran grandes deleciones contiguas de segmentos. Mutaciones en los genes *pair-rule* (genes de la regla par, como *engrailed* y *wingless*) muestran defectos en todos los segmentos. Esto sugirió a los investigadores que la segmentación requiere tres niveles de organización en un patrón temporal específico (en el Capítulo 23 se presentan los detalles del modelo de desarrollo embrionario de Nüsslein-Volhard y Wieschaus).

Los Drs. Nüsslein-Volhard y Wieschaus publicaron los resultados de su estudio en 1980 en la revista *Nature*. Su trabajo fue inmediatamente reconocido por su importancia. Cuando los científicos empezaron a buscar genes de desarrollo en otros organismos, descubrieron importantes semejanzas con *Drosophila*. Muchos genes del desarrollo de *Drosophila* tienen homólogos en vertebrados superiores incluidos los humanos, y estos genes de vertebrados afectan de manera parecida la formación del patrón embrionario inicial. Actualmente ya se han clonado la mayoría de los genes identificados por Nüsslein-Volhard y Wieschaus. La mayor parte codifican factores de transcripción y moléculas de señalización. Sus patrones de expresión reflejan las regiones afectadas en el mutante correspondiente.

En reconocimiento a la importancia de su investigación, los Drs. Nüsslein-Volhard y Wieschaus recibieron el premio Nobel de fisiología y medicina en 1995.



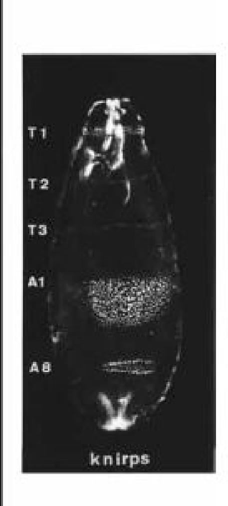


FIGURA 21.27 Preparaciones de cutícula de embriones tardíos de *Drosophila*. Las características de la cutícula indican la localización, el número y la orientación de los segmentos. El embrión normal (en el centro) muestra los tres segmentos torácicos (T) y los ocho segmentos abdominales (A). Los dos mutantes de genes gap, Kröppel y knirps, carecen de algunos segmentos contiguos torácicos o abdominales, como se indica. Las fotografías son del artículo de 1980 publicado en *Nature* por Nüsslein-Volhard y Wieschaus.

Ratón: un modelo para la terapia génica de ALS

La esclerosis amiotrófica lateral (ALS) es una enfermedad neurodegenerativa incurable que conduce a la destrucción progresiva de neuronas motoras en el cerebro y en la médula espinal. Cuando las neuronas motoras mueren, el cerebro deja de controlar los movimientos, y los músculos se debilitan y se atro-

fian. Esto conduce a dificultades en el habla, la respiración, la deglución y, con el tiempo, a la parálisis completa. A pesar de ello, la ALS no afecta a las capacidades intelectuales, al oído, a la vista ni a los otros sentidos. Generalmente los afectados de ALS tienen una función intestinal, urinaria y sexual normal. Cada año, en todo el mundo se diagnostican 1-2 casos de ALS por cada 100.000 personas. La mayoría de las terapias sencillamente alivian la gravedad de los síntomas. La ALS se denomina también la enfermedad de Lou Gehring, por el famoso jugador de *baseball* de los Yankees de Nueva York que murió de esta enfermedad en 1941. El científico consumado Stephen Hawking ha sufrido ALS durante la mayor arte de su vida, y muestra un coraje y una resistencia remarcables para hacer frente a esta enfermedad. (Véase la Figura 21.28).

Aproximadamente el 10 por ciento de los casos de ALS son familiares, heredados de forma autosómica dominante. Aproximadamente el 20 por ciento de estos casos familiares se asocian a mutaciones dominantes en el gen de la superoxido dismutasa Cu/Zn, *SOD1*. El gen *SOD1* codifica una enzima antioxidante (SOD) que convierte los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno libre. Al destruir los radicales libres oxidantes, SOD protege las células del daño causado por estos subproductos del metabolismo aeróbico.

Puesto que la ASL es difícil de estudiar en pacientes humanos, los investigadores necesitaban un modelo animal en el que encontrar las causas y diseñar tratamientos. Un año después de la identificación de mutaciones relacionadas a ALS en el gen humano *SOD1*, los genéticos generaron el primer ratón transgénico que llevaba un gen *SOD1* humano encontrado en muchos casos de ALS familiar. Puesto que la ALS se hereda como un carácter autosómico dominante, se esperaba que todos los ratones que llevasen una copia del gen *SOD1* mutante mostrasen síntomas parecidos a la ALS. El defecto en estos genes mutantes es una mutación en el exón 4 que resulta en la substitución de una alanina por una glicina en el aminoácido 93 de la proteína SOD (mutante G93A). Usando técnicas moleculares habituales, los investigadores clonaron un fragmento





FIGURA 21.28 Lou Gehrig (izquierda) y Stephen Hawking (derecha), dos personas famosas que han sufrido o sufren esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

de DNA genómico humano de 14,5 kilobases que contenía el gen G93A junto con su región promotora. Entonces inyectaron este DNA en células huevo de ratón y las devolvieron a madres adoptivas. Para determinar si los ratones resultantes eran transgénicos, los investigadores realizaron un análisis de PCR sobre DNA aislado de pequeñas muestras de la cola de los ratones. Las muestras de DNA que eran positivas a la PCR se examinaron por transferencia de Southern para verificar que el gen G93A estaba presente en el genoma del ratón. Se generaron diversos ratones transgénicos SOD, y estos trasmitieron el transgén al 50 por ciento de sus descendientes.

Los ratones transgénicos SOD desarrollan síntomas de ALS parecidos a los vistos en humanos. A los 4 meses de edad, estos ratones muestran un debilitamiento en sus extremidades anteriores y pérdida muscular. En un periodo de dos semanas se van paralizando progresivamente, y mueren a los 5 meses. El examen post-mortem revela la pérdida de neuronas motoras y la presencia de material fibroso en las neuronas, una característica también presente en la enfermedad humana.

¿Qué han aprendido los investigadores sobre las causas de la ALS a partir de estos ratones transgénicos modelo? Primero, la mutación G93A no parece afectar a la actividad de la enzima SOD. Además, los ratones que llevan mutaciones nulas homocigotas en el gen *SOD1* son normales. Por lo tanto, no es probable que la pérdida de actividad enzimática SOD sea la causa de la ALS. Segundo, no es probable que esta enfermedad sea causada simplemente por la sobreexpresión de *SOD1*. Ratones transgénicos control que expresan el gen *SOD1* normal humano producen grandes cantidades de SOD, pero no desarrollan los síntomas de la ALS. En conjunto, estos estudios indican que la presencia de mutaciones en *SOD1* es importante, a pesar del hecho de que no afectan a la actividad de SOD. Actualmente los investigadores creen que las mutaciones de *SOD1* en la ALS hacen que la proteína SOD sea tóxica. Actualmente se está estudiando la naturaleza de esta toxicidad.

Los ratones transgénicos *SOD* también proporcionan ideas sobre terapias potenciales para la ALS. Estos ratones se están usando para probar terapias con medicamentos potenciales, como selenio, cinc, vitamina E y factores de crecimiento neuronales. La mayor parte de estos medicamentos tienen un efecto escaso o no tienen ningún efecto en los ratones transgénicos *SOD*, y en algunos casos estos resultados se han confirmado en ensayos clínicos en humanos. El único tratamiento prometedor hasta la fecha parece ser la creatina, que mejora la actividad motora y la supervivencia de los ratones *SOD* G93A.

El año 2003 se hizo público un excitante avance en el tratamiento de la ALS. Anteriormente, los factores de crecimiento neuronales, como los factores neurotróficos ciliares y el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1, del inglés *insuline-like growth factor 1*) mostraban pocos efectos cuando se probaban en ensayos clínicos. Estos ensayos implicaban la inyección subcutánea de factores de crecimiento o directamente en el fluido espinal, pero no estaba claro si los factores alcanzaban las neuronas motoras relevantes. En el número del

8 de agosto de 2003 de la revista *Science*, B. K. Kaspar y sus colaboradores comunicaron un incremento significativo de la supervivencia de los ratones transgénicos *SOD* G93A suministrando el gen *IGF-1* a las neuronas por vía de terapia génica.

Los investigadores clonaron el gen *IGF-1* en el DNA de un virus adeno-asociado (AAV) especialmente modificado. Este virus se había alterado genéticamente de modo que no podía reproducirse; sin embargo, mantenía una característica importante del virus progenitor: la capacidad de ser incorporado por las terminaciones nerviosas en el músculo y de ser transportado a través del axón nervioso hasta el cuerpo celular de las neuronas motoras en la médula espinal (un proceso denominado transferencia retrógrada). Una vez el virus ha llegado al cuerpo celular de la neurona motora, permanece intacto y su DNA no se integra en el genoma neuronal. Tras el transporte retrógrado, el vector AAV-IGF dirige la transcripción, la traducción y la secreción de IGF-1 biológicamente activo (Figura 21.29).

En un experimento, Kaspar y sus colaboradores inyectaron virus AAV-IGF, o AVV control, en los músculos de ratones SOD G93A de 60 días de edad (antes del desarrollo de los síntomas parecidos a la ALS). A los 90 días, los ratones control desarrollaron la enfermedad; sin embargo, los ratones tratados con AVV-IGF permanecieron sin desarrollar la enfermedad hasta el día 120. La supervivencia máxima de los animales controles fue de 140 días, mientras que la de los animales tratados con AVV-IGF fue de 265 días. Todavía más importante, estos beneficios también se produjeron en los ratones que ya eran sintomáticos. El resultado de este estudio de terapia génica en ratones transgénicos es prometedor para los pacientes humanos afectados de ALS. Actualmente se están diseñando ensayos clínicos con este método de terapia génica.

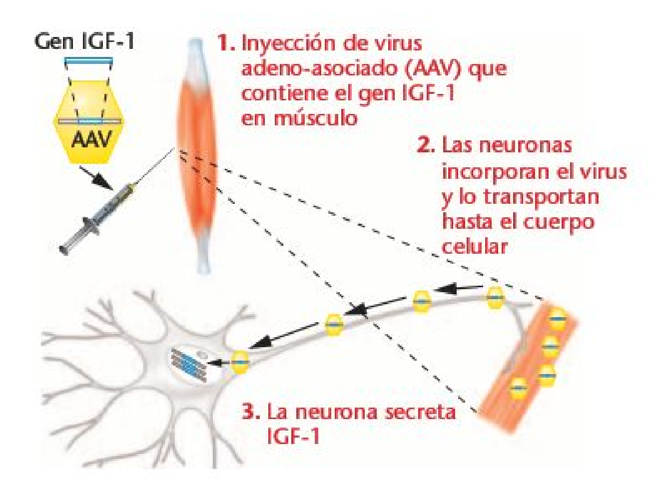


FIGURA 21.29 Técnica de terapia génica en el ratón transgénico *SOD*.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Los genéticos diseccionan la función génica en organismos modelo que muestran el proceso biológico a estudiar. Estos organismos modelo se eligen porque producen una progenie abundante en un corto periodo de tiempo, son fácilmente mutagenizables y se pueden someter a apareamientos controlados.
2. Es posible usar organismos modelo como levadura o *Drosophila* para estudios genéticos porque muchos de los genes y de los procesos moleculares que gobiernan sus funciones biológicas están compartidos a través de la evolución. Muchas secuencias génicas están conservadas desde levadura hasta los vertebrados superiores, y a menudo estos genes desempeñan funciones similares en una amplia gama de organismos.
3. El análisis por genética directa empieza con el aislamiento de mutantes que muestran diferencias de fenotipo respecto al carácter de interés. Al aislamiento de los mutantes le sigue la definición de la ruta genética, la clonación del gen y la generación de más mutantes para entender la ruta biológica. De esta manera, los mutantes definen la función normal del gen.
4. En los rastreos de genética directa, el objetivo es alterar un gen cada vez, y alterar todos los genes implicados en una ruta genética específica. De esta manera, todos los genes relevantes estarán mutados al menos una vez en la población de organismos mutagenizados. Para generar suficientes mutaciones para alterar todos los genes implicados en una ruta genética, los genéticos deben someter al organismo modelo a mutagénesis, generalmente tratando el organismo con productos químicos o radiación.
5. Para extender un análisis genético directo, los genéticos pueden mutagenizar el primer mutante y rastrear en busca de segundas mutaciones que supriman o incrementen el fenotipo mutante original.
6. El análisis por genética reversa empieza con un gen silvestre clonado o con proteína purificada y progresa hacia la mutagénesis específica de sitio y el análisis fenotípico, el orden opuesto del usado en la genética directa.
7. Una vez se ha clonado un gen por el método que sea, incluyendo su selección a partir de un proyecto de secuenciación de un genoma o por complementación funcional, éste se puede estudiar usando una amplia gama de ensayos genéticos y bioquímicos. Estos ensayos incluyen la búsqueda de homologías por ordenador, ensayos de expresión génica, técnicas de domiciliación génica y mutagénesis específica de sitio.
8. Las técnicas de RNAi permiten a los genéticos generar *knockouts* génicos a nivel de expresión, en ausencia de cualquier mutación genética en el gen a alterar.
9. Las microordenaciones de DNA y las otras técnicas de genómica funcional de gran cantidad de datos proporcionan ideas de las interacciones de miles de productos génicos simultáneamente.

Ideas y soluciones

1. Ha aislado ocho cepas mutantes de *Drosophila*, cada una de las cuales lleva una mutación letal recesiva en algún sitio del cromosoma 3. Ha denominado a esas cepas el^1, el^2, el^3, etc., ya que las mutaciones causan letalidad embrionaria (*el*) acompañada de la pérdida de segmentos torácicos. Todas las cepas se mantienen en reservas balanceadoras. Quiere determinar si esas mutaciones son alélicas o han ocurrido en genes separados del cromosoma 3. Para determinarlo realiza un análisis de complementación, apareando todas las combinaciones de las reservas y examinado los embriones buscando el 25 por ciento de letalidad con defectos en los segmentos. Obtiene los siguientes datos. Los genotipos cruzados se indican en la fila superior y en la columna de la izquierda. La progenie viable se indica con un (+), y el 25 por ciento de letalidad embrionaria con defectos en la segmentación se indica con un (−).

	el^1	el^2	el^3	el^4	el^5	el^6	el^7	el^8
el^1	−	−	−	+	+	−	−	+
el^2		−	−	+	+	−	−	+
el^3			−	+	+	−	−	+
el^4				−	−	+	+	+
el^5					−	+	+	+
el^6						−	−	+
el^7							−	+
el^8								−

¿Cuántos genes representan estas mutaciones? ¿En qué grupo de complementación cae cada mutante?

Solución: Una manera de analizar los datos de complementación es examinar sistemáticamente cada apareamiento. Obviamente, cuando un mutante se cruza consigo mismo conduce al fenotipo de segmentación letal. Sin embargo, cuando el^1 se cruza con el^2, el^3, el^6 o el^7 también conduce al fenotipo de segmentación letal. Por lo tanto, todos estos mutantes (el^1, el^2, el^3, el^6 y el^7) pertenecen a un mismo grupo de complementación. Todavía falta analizar el^1 se cruza con el^4, el^5, y el^8. Cuando se aparean los mutantes el^4 y el^5, producen el fenotipo letal embrionario con defectos en la segmentación. Por lo tanto, estos dos mutantes (el^4 y el^5) pertenecen a un mismo grupo de complementación, siendo un grupo distinto al primero. El mutante el^8 complementa con todos los otros mutantes y, por consiguiente, forma su propio grupo de complementación. O sea, que hay tres grupos de complementación representados en estos datos.

2. En la disección por genética directa, el objetivo es realizar un rastreo genético saturante. De esta manera, cada gen que pudiese afectar un fenotipo debería haber mutado al menos una vez en una población de organismos mutagenizados. Sin embargo, parece que algunos genes no experimentan mutaciones, incluso en un rastreo a saturación. ¿Puede sugerir dos motivos por lo cuáles podría ser que un gen no se revelase nunca en un rastreo genético?

Solución: El principio que hay detrás de los rastreos mutagénicos es que las mutaciones en genes relevantes afectarán a un fenotipo detectable. Si el fenotipo no puede ser detectado, se puede pasar por alto una mutación. Por ejemplo, diversos genes pueden contribuir independientemente a un mismo fenotipo. Este hecho se conoce como redundancia génica. Una mutación en uno de estos genes no afectará al genotipo; por lo tanto, el gen no se revelará con un rastreo por genética directa. Otra razón por la que se puede pasar por alto una mutación es que la mayoría o todas las mutaciones en un gen conduzcan a letalidad dominante. En organismos haploides como levadura, los organismos mutagenizados morirían y no podrían ser rastreados para ese fenotipo. De manera parecida, en organismos diploides como *Drosophila*, cualquier progenie F^1 de las moscas mutagenizadas que heredase un gen mutado letal dominante moriría y no sería detectada, a menos que la letalidad estuviese acompañada por un fenotipo observable antes de morir.

3. Ha aislado una cepa mutante de sensibilidad a la temperatura de *S. cerevisiae* que es nula para el gen *CDC53*. Este gen funciona durante el ciclo celular de levadura permitiendo que las células progresen de la mitosis a la fase G1 del ciclo celular. A temperatura restrictiva, $cdc53^{ts}$ detiene las células a media mitosis, con un fenotipo característico.

(a) ¿Cuál sería el fenotipo de células haploides $cdc53^{ts}$ tras 36 horas creciendo a temperatura restrictiva?

(b) ¿Cómo usaría esta cepa mutante de levadura para identificar genes cuyos productos interaccionasen con la proteína CDC53, permitiendo que ésta funcionase adecuadamente en la transición M/G1?

(c) ¿Cómo usaría esta cepa mutante para clonar el gen *CDC53* de células humanas?

Solución (a): Para responder a esta pregunta, necesita saber los fenotipos de S. cerevisiae durante el ciclo celular (Figura 21.23). Las células que no puede progresar de la mitosis hasta G1 permanecen unidas, aunque el DNA replicado puede migrar hasta la célula hija. Por lo tanto, a temperatura restrictiva, todas las células del cultivo $cdc53^{ts}$ tendrán este fenotipo.

Solución (b): Una manera de hacerlo es realizar un rastreo de supresores. En un rastreo de supresores, la cepa $cdc53^{ts}$ se somete a una segunda ronda de mutagénesis, y las células se rastrean en busca de un ciclo celular normal a temperatura restrictiva. Estos mutantes supresores se examinarían para determinar si la segunda mutación se produjo en el mismo gen (una reversión) o en otros sitios (una mutación supresora en un segundo sitio). Las mutaciones supresoras en segundos sitios se pueden producir en genes cuyos productos interaccionan con la proteína CDC53. Una segunda aproximación sería usar un anticuerpo que reconociese CDC53 para inmunoprecipitar CDC53 de extractos de células de levadura silvestres. Bajo las condiciones adecuadas, cualquier proteína que interaccionase con CDC53 inmunoprecipitaría junto con esta proteína. Estas proteínas podrían purificarse, se podría determinar su secuencia aminoacídica, y esta secuencia se podría usar para realizar un rastreo por genética reversa para clonar sus genes.

Solución (c): Sería posible usar la cepa *cdc53*^{ts} en un análisis de complementación funcional. En algunos casos, un gen humano sustituiría la pérdida de función de una levadura mutante, devolviendo el mutante de levadura al tipo silvestre. Para hacer complementación funcional, las células de levadura se transforman sistemáticamente con clones de una biblioteca de cDNA humana. Entonces se rastrean las células *cdc53*^{ts} transformadas buscando divisiones celulares normales a temperatura restrictiva. Si cualquiera de los clones de cDNA revierte la cepa *cdc53*^{ts} al tipo silvestre, podría contener un clon humano funcionalmente complementario. Se puede cultivar la cepa de levadura transformada revertiente, se puede recuperar el clon de cDNA de esta cepa de levadura, y la identidad del inserto de cDNA se puede determinar por secuenciación de DNA.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. ¿Qué es una mutación supresora y cómo usan los genéticos estas mutaciones para caracterizar la función génica?

2. ¿Qué organismo modelo (levadura, Drosophila, ratón o humano) elegiría para estudiar las siguientes condiciones y procesos genéticos? Explique por qué.
- (a) Control del desarrollo de los riñones.
- (b) Cáncer.
- (c) Fibrosis quística.
- (d) Metabolismo de las purinas.
- (e) Función inmunitaria.
- (f) División celular.

3. Está intentando generar un ratón knockout que lleve una mutación nula en homocigosis en el protooncogén *c-myc*. Empieza transformando células ES de una cepa normal de ratón con su DNA clonado, que lleva un gen de resistencia a neomicina insertado en medio del segundo exón del gen *c-myc* murino. Tiene 20 colonias de células ES que crecen en presencia de medio que contiene neomicina. Describa dos métodos que podría usar para verificar que estas células ES son *knockout* para *c-myc*.

4. Describa el método de mutagénesis específica de sitio mediada por un oligonucleótido.

5. A menudo los genéticos emplean mutaciones supresoras para definir la función génica. Los mutantes supresores se generan de la misma manera que los otros mutantes, exponiendo los organismos a los efectos de un mutágeno. En un experimento se somete a mutagénesis con EMS a individuos de *Drosophila* que tienen una mutación recesiva en el color de los ojos (ojos rosas). Se rastrea la progenie de las moscas para el color de los ojos. En este rastreo de mutagénesis aparecen 23 moscas con ojos silvestres (rojos).
- (a) ¿Cómo determinaría si las mutaciones supresoras fueron debidas a la mutagenesis con EMS o fueron espontáneas?
- (b) ¿Cómo determinaría si la mutación supresora fue una reversión de la primera mutación o fue debida a una mutación en un segundo sitio?
- (c) ¿Cómo localizaría el sitio de la mutación supresora?
- (d) Una de las mutaciones supresoras se produjo en el mismo gen que la mutación original; sin embargo, no era una reversión sencilla de la mutación original. ¿Qué otras posibilidades podrían explicar la supresión?

6. ¿Qué son los cromosomas balanceadores de *Drosophila*, que características tienen y para qué los usan los genéticos?

7. ¿Cómo generan mutaciones los transposones? ¿Qué mutaciones generan estos elementos móviles?

8. ¿Cómo usan los genéticos el color del pelaje de los ratones como parte del método para hacer ratones *knockout*? En ausencia de marcadores de color del pelaje, ¿hay otra manera en que podría funcionas este método?

9. Las levadura con mutaciones en el gen pro-1 son incapaces de sintetizar el aminoácido prolina, que es necesario para un crecimiento normal. La cepa silvestre de levadura puede sintetizar prolina. ¿Cómo seleccionaría mutantes supresores de esta cepa mutante de levadura?

10. En la técnica *ClB* de detección de mutantes en *Drosophila*,
- (a) ¿Qué tipos de mutaciones pueden detectarse?
- (b) ¿Cuál es la importancia del gen *l*?
- (c) ¿Qué necesidad hay de que el cromosoma X tenga el supresor de entrecruzamientos *(C)*?
- (d) ¿Qué es *C*?

11. ¿Por qué los genéticos se muestran tan entusiasmados con la utilización de levadura como organismo modelo? ¿Cuál es la ventaja de tener un ciclo biológico haploide?

12. Para estudiar el ciclo celular, los genéticos generan mutaciones de sensibilidad a la temperatura en *S. cerevisiae*. Si estuviese diseñando un experimento para obtener diversas mutaciones recesivas de sensibilidad a la temperatura del ciclo de división celular en levadura, ¿cómo seleccionaría estos mutantes? ¿Cómo podría distinguir entre mutaciones cdc y los otros tipos de mutaciones de sensibilidad a la temperatura?

13. Como parte de su investigación sobre como se forman las paredes celulares de la levadura *S. cerevisiae*, que se reproduce por gemación, purifica una proteína que se sintetiza cuando las células se dividen y que se incorpora en la nueva pared celular al crecer la célula. Su siguiente tarea es clonar su gen.
- (a) ¿Qué estrategia usaría para clonar el gen de esta proteína de pared celular?
- (b) Una vez ha clonado el gen, ¿qué haría para determinar si esta proteína es importante para el crecimiento de la pared celular de levadura?

14. Ha seleccionado un gen que parece interesante del genoma de ratón. Cree que ese gen puede estar implicado en el desarrollo de ratón, ya que el DNA de un parte del gen codifica un dominio clásico con caja homeótica. Quiere encontrar dónde y cuándo se expresa este gen. ¿Qué experimentos haría para determinar la expresión temporal y espacial específica de este gen?

15. Aunque generalmente los modernos métodos de genómica de gran cantidad de datos como las ordenaciones de expresión génica son consideradas las tecnologías del futuro, muchos científicos se muestran escépticos sobre su auténtico valor. ¿Qué dos limitaciones pude ver en la utilización de estas ordenaciones de DNA? ¿Cómo pueden superarse estas limitaciones?

16. Describa los pasos implicados en la transformación mediada por elementos *P* en *Drosophila*. ¿Qué diferencias hay entre este modo de transformación y los métodos usados para generar ratones transgénicos?

17. El Proyecto Genoma *Drosophila* de Berkeley está generando una colección de cepas de *Drosophila* cada una de las cuales contiene una inserción de un elemento *P* en un gen diferente. El objetivo es generar mutaciones nulas en todos los genes esenciales del genoma de *Drosophila*. ¿En qué será útil esta colección de cepas para el análisis genético? Describa un experimento que utilice la colección de Berkeley.

18. Una complicación de la transgénesis en ratones es que el transgén se integre al azar en una región codificante de un gen endógeno de ratón, o en una región reguladora. ¿Cuál sería la consecuencia de una integración aleatoria como ésta? ¿Cómo complicaría esto el análisis genético del transgén?

19. ¿Es posible realizar un análisis genético directo en *Drosophila* sin usar un mutágeno? Si es que sí, explique cómo podría hacerse.

20. Describa las diferencias entre seleccionar mutantes y rastrear en busca de mutaciones.

21. Durante varios años ha estado purificando una pequeña cantidad de proteína de sangre humana, una proteína que sospecha que está implicada en la cascada de coagulación sanguínea. Puesto que tiene tan poca proteína, no pude generar anticuerpos apara usarlos como sonda en una biblioteca de expresión de cDNA. Como alternativa, obtiene un trozo de la secuencia aminoacídica del extremo aminoterminal de esta proteína. La secuencia aminoacídica es:

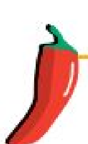
Met-Pro-Lys-Glu-Ala-Ile-Gly-

(a) ¿Cómo usaría esta información para clonar el gen?
(b) Una vez ha clonado el gen, ¿cómo podría verificar que es realmente el gen que codifica su proteína?

22. ¿Cuál es la diferencia entre análisis por complementación genética y por complementación funcional?

23. ¿Qué es el RNAi y cómo funciona? Describa dos maneras en que los investigadores pueden introducir moléculas de RNAi en las células.

24. Un análisis de microordenaciones de DNA revela 12 genes que se expresan en niveles superiores a los normales en un tumor de hígado de ratón respecto a hígados normales. El examen de la secuencia del DNA de estos 12 genes muestra que todos ellos han sido ya secuenciados y que su secuencia se encuentra disponible en una base de datos del genoma de ratón; sin embargo, no hay ninguna información sobre ellos exceptuando su tamaño, el número de exones e intrones, etc. Elige estudiar 2 de estos 12 genes. ¿Cuáles son los primeros tres pasos que haría para determinar la identidad y la función de estos dos genes?



Problemas extra-picantes

25. Su proyecto de tesis doctoral consiste en identificar todos los genes implicados en una ruta biosintética de *Drosophila*. Esta ruta conduce al oscurecimiento y al endurecimiento de de la cutícula adulta una vez la mosca ha emergido de la pupa.
(a) ¿Qué tipo de mutágeno elegiría y por qué?
(b) ¿Esperaría que las mutaciones fuesen letales? ¿Por qué? ¿Cómo podría decir si las mutaciones de esta ruta serían letales o no?
(c) ¿Cómo rastrearía estos mutantes si no supiese si van a ser letales o no?
(d) Tras realizar numerosos rastreos mutacionales con miles de moscas no obtiene ninguna mutación que afecte al oscurecimiento ni al endurecimiento de la cutícula adulta. ¿Qué posibilidades podrían explicarlo? ¿Qué haría para probar su hipótesis?

26. Usted está interesado en la base genética de una enfermedad humana caracterizada por degeneración neuronal y la deposición anormal de una proteína en el cerebro. Se ha clonado un gen candidato humano, y es posible que este gen esté implicado en la generación de esta enfermedad. Usted trabaja en un laboratorio que usa *S. cerevisiae* como organismo modelo para estudios de metabolismo. ¿Consideraría utilizar levadura como organismo modelo para estudiar esta enfermedad? Explique por qué lo consideraría o por qué no, y qué experimentos haría antes de tomar una decisión final.

27. Como parte de un proyecto genómico, obtiene la secuencia de DNA de un fragmento genómico de una cepa silvestre de levadura. Tras examinar la secuencia, observa que contiene un largo ORF precedido por un promotor, y que hay una secuencia de poliadenilación en el extremo 3' el ORF. Por eso, probablemente este fragmento de DNA contenga un gen. Está interesado en determinar qué gen es y que función desempeña. Su primer paso es generar una cepa mutante de levadura que sea nula para este gen. ¿Cómo podría usar el clon genómico de este gen para generar una mutación nula? Proporcione detalles de cada uno de los pasos que usaría en este procedimiento.

28. Mientras analiza cierta información nueva del proyecto genoma de ratón, observa una secuencia de DNA que podría codificar un segmento interesante de aminoácidos. Esta secuencia de aminoácidos forma un motivo conocido como dominio hélice-giro-hélice. Estos dominios se encuentran en docenas de proteínas en organismos tan diversos como moscas, *Arabidopsis* y humanos. ¿Cómo verificaría que esta secuencia de DNA forma parte de un gen y no es simplemente un trozo aleatorio de DNA «basura»? Suponiendo que esta secuencia de DNA fuese parte del gen *bona fide*, ¿cómo procedería para investigar la identidad y la función potencial de este gen de ratón?

29. Existen diversos modelos de ratón de la fibrosis quística (CF) humana. Todas estas cepas de ratón son transgénicas, y contienen

una mutación específica del gen CFTR. Estas mutaciones son las mismas que las observadas en humanos con variaciones de CF. Estos ratones transgénicos CF se usan para estudiar la diferente gama de fenotipos que caracterizan la CF en los humanos. También se utilizan como modelos para probar medicamentos potenciales para la CF. Desgraciadamente, la mayoría de las cepas de ratones CF no muestran uno de los síntomas más característicos de la CF humana, la congestión pulmonar. ¿Se le ocurre alguna razón por la que las cepas de ratones con CF no muestren este síntoma de la CF humana?

30. Un famoso grupo de investigación quería encontrar el perfil de expresión tisular de un nuevo gen con caja homeótica *(HOX)* que habían descubierto durante la búsqueda de secuencias de DNA en una base de datos del genoma de *Drosophila*. En su primer grupo de experimentos, marcan una sonda de cDNA para el nuevo gen *HOX* e hibridan esta sonda con larvas de *Drosophila* de tres días. La sonda de cDNA hibrida con los túbulos de Malpigio y con el sistema nervioso. Encantados con estos nuevos datos, y a medio escribir el artículo científico para su publicación, deciden verificar el resultado realizando un ensayo de inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra la proteína *HOX*. Horrorizados, ven como el anticuerpo se une exclusivamente a los testículos de la larva. Explique por qué puede haber esta diferencia entre los resultados de hibridación in situ y de inmunofluorescencia. ¿Qué deberían hacer a continuación?

LECTURAS SELECCIONADAS

Adams, J.M. et al. 1985. The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318:533-38.

Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-92.

Dykxhoorn, D.M. et al. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:457-67.

Forsburg, S.L. 2001. The art and design of genetic screens: Yeast. *Nature Reviews Genetics* 2:659-68.

Fraser, A. 2004. RNA interference: Human genes hit the big screen. *Nature* 428:375-78.

Gitschier, J. et al. 1984. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-30.

Hartwell, L.H. et al. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46-51.

Hartwell, L.H. et al. 1970. Genetic control of the cell division cycle in yeast, I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66: 352-59.

Kaspar, B.K. et al. 2003. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301:839-42.

Kwon, B.S, et al. 1987. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse *c-albino* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7473-77.

Leder, A. et al. 1986. Consequences of widespread deregulation of the *c-myc* gene in transgenic mice: Multiple neoplasms and normal development. *Cell* 45:485-95.

Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801.

Oliver, S.G. 1997. From gene to screen with yeast. *Curr. Opin. Genetics and Development* 7:405-09.

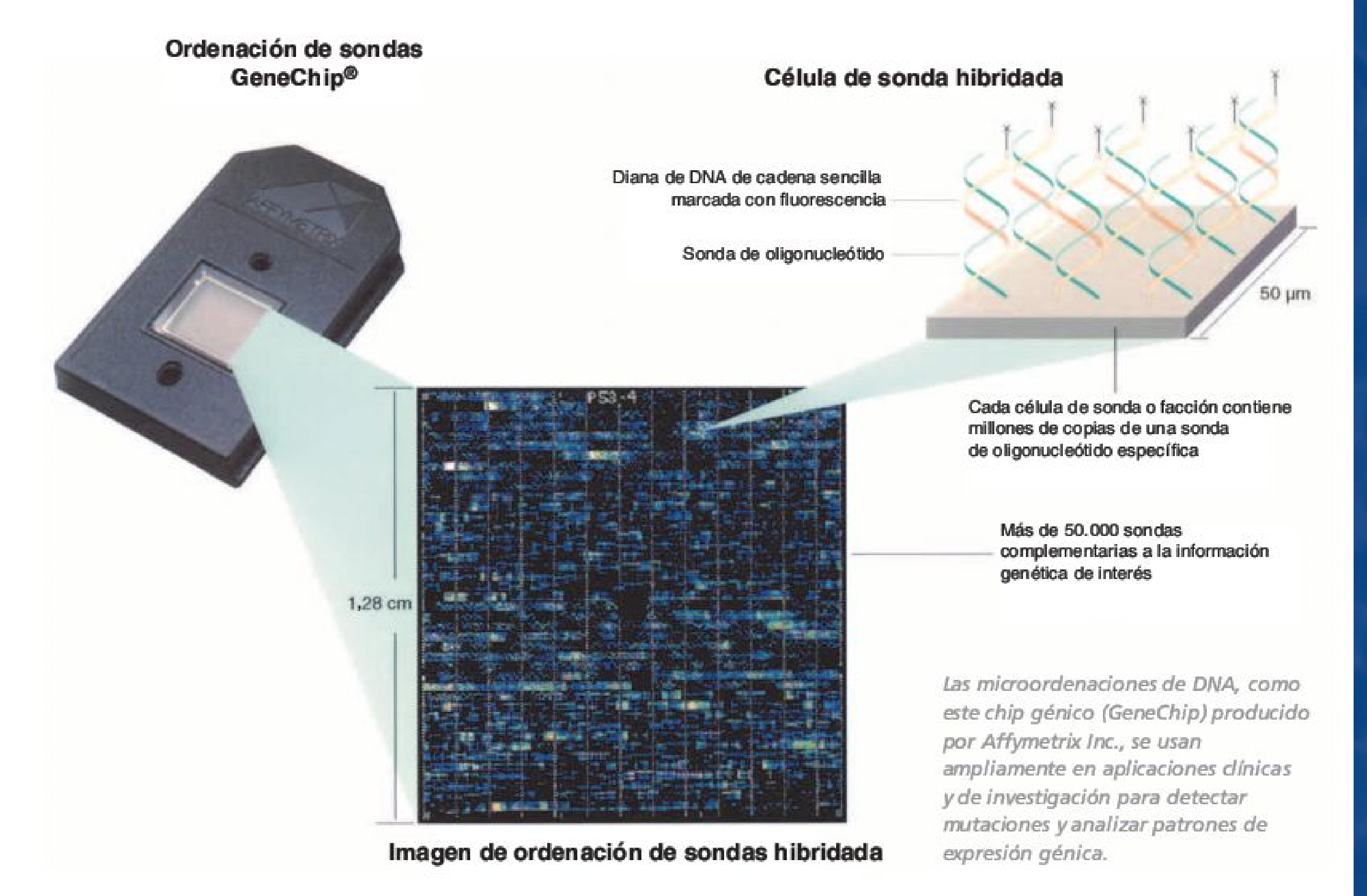
Probst, F.J. et al. 1998. Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 280:1444-47.

Steinmetz, L.M. and Davis, R.W. 2004. Maximizing the potential of functional genomics. *Nature Reviews Genetics* 5:190-201.

St. Johnston, D. 2002. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics* 3:176-88.

Wieschaus, E. 1995. From molecular patterns to morphogenesis: The lessons from *Drosophila*. Nobel lecture, December 8, 1995. Published in Nobel E-museum: *http://www.nobel.se/medicine/laureates/1995/press.html*.

Aplicaciones y ética de la biotecnología



Las microordenaciones de DNA, como este chip génico (GeneChip) producido por Affymetrix Inc., se usan ampliamente en aplicaciones clínicas y de investigación para detectar mutaciones y analizar patrones de expresión génica.

Conceptos del capítulo

- La biotecnología ha revolucionado la agricultura mediante el desarrollo y la introducción de cultivos genéticamente modificados que son resistentes a herbicidas y a plagas, y ha mejorado su valor nutritivo.
- Las plantas y los animales genéticamente modificados pueden producir proteínas humanas usadas para tratar enfermedades.
- La tecnología del DNA recombinante se usa para diagnosticar enfermedades genéticas, detectar heterocigotos y rastrear el genoma humano para detectar enfermedades que pueden estar décadas sin manifestarse.
- La terapia génica por transferencia de copias clonadas de alelos funcionales a tejidos diana se usa para tratar enfermedades genéticas y sus resultados son variados. Se hace necesario el desarrollo futuro de la tecnología de los vectores.
- La terapia génica y la información procedente del Proyecto Genoma Humano plantean problemas éticos que están siendo abordados mediante políticas sociales y cambios legales.
- Los principales descubrimientos en la cartografía de genes humanos y en la identificación de productos y funciones génicos proceden de la utilización de las técnicas de DNA recombinante.
- La huella molecular del DNA puede identificar personas concretas dentro de una gran población y se usa ampliamente en medicina forense.

En 1982, la *Food and Drug Administration* (Secretaría de Estado para Alimentación y Medicamentos de los EEUU) aprobó la comercialización de insulina humana producida por células bacterianas genéticamente modificadas. Antes de esta fecha, la insulina se extraía químicamente de páncreas bovinos y porcinos obtenidos de los mataderos. La producción de insulina mediante tecnología del DNA recombinante asegura el suministro regular de un producto génico purificado para tratar esta enfermedad y representó un hito en el desarrollo de la industria biotecnológica. La difusión del DNA recombinante más allá de la investigación de laboratorio, ejemplificada por la producción de insulina humana, marcó el inicio de cambios importantes en nuestra vida diaria. Más de 20 años después de la aparición de la insulina recombinante, estamos rodeados de productos de la biotecnología. La biotecnología se usa para diagnosticar enfermedades y producir medicamentos, productos químicos industriales e incluso leche y otros productos que se encuentran en los supermercados.

En el Capítulo 19 se describieron los métodos usados para construir y analizar moléculas de DNA recombinante, y en el Capítulo 20 se examinó la utilización de esta tecnología en la genómica. En este capítulo se describe cómo se están utilizando estas herramientas en investigación y en aplicaciones comerciales en la industria biotecnológica, y en los problemas éticos que su uso plantea. Trataremos de algunas aplicaciones que ilustran el poder de la tecnología del DNA recombinante para (1) generar nuevas variedades de plantas y animales, (2) producir comida, (3) diagnosticar y tratar enfermedades, (4) medicina forense y (5) cartografiar genes humanos. La biotecnología también se usa para producir proteínas terapéuticas en plantas y en animales genéticamente modificados. Empezaremos considerando cómo la biotecnología ha cambiado los métodos básicos de producción de alimentos y cómo ha generado controversias económicas, sociales y medioambientales. Después, examinaremos el impacto del DNA recombinante en medicina, desde el análisis prenatal de genotipos y el rastreo genómico hasta el tratamiento de enfermedades genéticas mediante terapia génica. Además, también consideraremos el impacto de la biotecnología en medicina forense. Finalmente, discutiremos algunas maneras en que se está usando la biotecnología en investigación básica, usando la **cartografía génica** como ejemplo.

22.1 La biotecnología ha revolucionado la agricultura

Aunque las técnicas de DNA recombinante se desarrollaron originalmente para facilitar la investigación básica sobre la organización génica y la regulación de la expresión, los métodos de transferencia génica también son la base de la industria biotecnológica. La biotecnología se usa para producir una amplia gama de productos, incluyendo hormonas, factores de coagulación, plantas resistentes a herbicidas, enzimas para la producción de alimentos y vacunas. Durante la última década, esta industria ha crecido hasta formar un segmento multimillonario de la economía. En esta sección se resumirán algunos de los usos actuales de la biotecnología en agricultura y las preocupaciones generadas por la aplicación de la tecnología del DNA recombinante.

Cultivos transgénicos y resistencia a herbicidas

A nivel mundial, los daños producidos por las malas hierbas destruyen el 10 por ciento de los cultivos. Para combatir este problema, los agricultores usan más de 100 herbicidas diferentes, lo que supone un coste anual de más de 10.000 millones de dólares. Algunos de estos herbicidas también matan los cultivos, mientras que otros permanecen en el medio ambiente o son transportados por las corrientes de agua y contaminan el suministro local de este líquido. La generación de plantas resistentes a herbicidas es una de las maneras de mejorar el rendimiento de los cultivos, reduciendo al mismo tiempo el impacto medioambiental de los herbicidas. Para lograrlo, se han transferido vectores que transportan genes de resistencia a herbicidas a plantas de cultivo.

Vamos a examinar cómo se transfirió la resistencia a un herbicida a plantas de cultivo como la soja y el maíz. El herbicida **glifosato** es efectivo a muy bajas concentraciones, no es tóxico para humanos y los microorganismos del suelo lo degradan rápidamente. El glifosato mata las plantas inhibiendo la acción de una enzima de los cloroplastos denominada EPSP sintetasa. Esta enzima es importante para la biosíntesis de aminoácidos tanto en bacterias como en plantas. Si no pueden sintetizar estos aminoácidos vitales, las plantas se marchitan y mueren.

El primer paso para producir una planta resistente a glifosato fue el aislamiento y la clonación del gen de la EPSP sintasa de una cepa resistente a glifosato de *E.coli*. El gen EPSP se clonó en un vector y se situó junto a secuencias promotoras de un virus vegetal, corriente arriba de secuencias vegetales de terminación de la transcripción. El vector recombinante se transfirió en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 22.1). Entonces, las bacterias que contenían el plásmido se usaron para infectar células en discos cortados de hojas de la planta. Se analizó la capacidad de los callos formados tras la infección con *A. tumefaciens* de crecer en presencia de glifosato. Se hizo crecer a las plantas transgénicas generadas de callos resistentes a glifosato rociándolas con concentraciones de glifosato cuatro veces superiores a las necesarias para matar a las plantas silvestres. Las plantas transgénicas que producían EPSP sintetasa en gran cantidad crecieron y se desarrollaron, mientras que las plantas control se marchitaron y murieron.

Actualmente ya se encuentra maíz y soja resistente a glifosato en los mercados de EEUU y de otros países. Desde su introducción en 1996, los cultivos modificados genéticamente que toleran los herbicidas y resisten las plagas de insectos se han plantado en diversos países (Figura 22.2). En los Estados Unidos, los tres cultivos principales genéticamente modificadas son

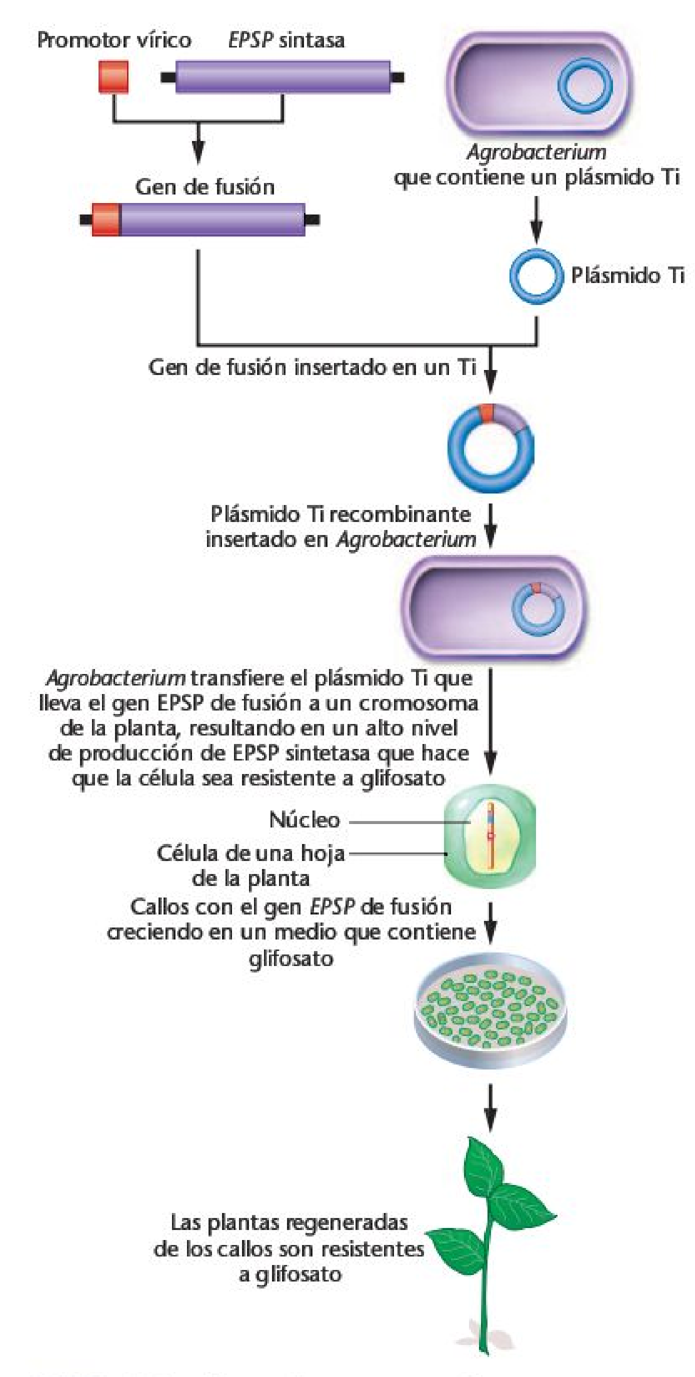


FIGURA 22.1 En la transferencia génica de resistencia a glifosato, el gen *EPSP sintasa* se fusiona con un promotor del virus del mosaico de la coliflor. Este gen de fusión se transfiere a un vector plasmídico Ti, y el vector recombinante se inserta en un huésped de *Agrobacterium*. La infección por *Agrobacterium* de células vegetales en cultivo transfiere el gen de fusión *EPSP sintasa* a un cromosoma de la célula vegetal. Las células que adquieren el gen pueden sintetizar grandes cantidades de EPSP sintetasa, haciéndolas resistentes al herbicida glifosato. Las células resistentes se seleccionan por crecimiento en un medio que contiene el herbicida. Las plantas regeneradas de estas células son resistentes al herbicida.

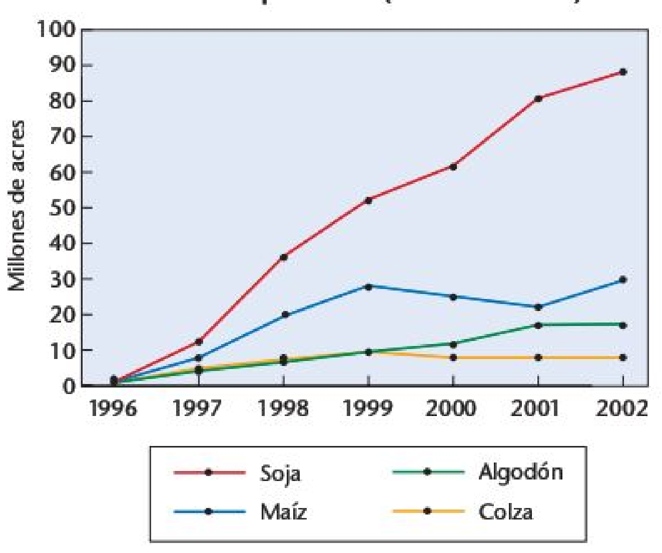


FIGURA 22.2 Desde su introducción en 1996, la soja, el maíz y el algodón genéticamente modificados se han plantado en millones de acres[1] anualmente en diversos países. Los EEUU producen dos terceras partes de la producción mundial de plantas de cultivo genéticamente modificadas.

el maíz, la soja, y el algodón. El año 2000, el 26 por ciento del maíz, el 68 por ciento de la soja y el 69 por ciento del algodón plantado en los EEUU era genéticamente modificado. Los países desarrollados también han modificado genéticamente plantas de cultivo que han sido ampliamente adoptadas por los agricultores. En China, por ejemplo, más del 30 por ciento del algodón plantado el año 2000 procedía de cepas genéticamente modificadas para resistir plagas de insectos[2].

Incremento nutritivo de los cultivos

Durante los últimos 50-100 años, la mejora genética de las plantas de cultivo mediante los métodos tradicionales de selección artificial y de cruzamientos genéticos ha resultado en una mejora drástica de la productividad y en un incremento de las capacidades nutritivas. Por ejemplo, el rendimiento del maíz se ha multiplicado por cuatro durante los últimos 60 años, y más de la mitad de este incremento es debido a la mejora genética mediante selección artificial. El brócoli contiene glucosinolatos, unos compuestos que se cree que desempeñan una función protectora contra el cáncer por la activación de la enzima anticancerígena quinolona reductasa. Nuevas variedades

[1] *Nota del traductor:* un acre es una medida anglosajona de superficie que equivale a 40 áreas y 47 centiáreas.

[2] *Nota del traductor:* el año 2004, España, Méjico, Argentina y Paraguay estaban entre los catorce países con más extensión de plantas genéticamente modificadas sembradas, superando todos ellos las 50.000 hectáreas cultivadas.

híbridas producidas mediante cruces convencionales han incrementado cien veces la capacidad de inducir los niveles de esta enzima en células de ratón.

La transferencia génica mediante técnicas de DNA recombinante ofrece una nueva manera para incrementar al valor nutritivo de las plantas. Muchos cultivos son deficientes en algunos de los nutrientes requeridos en la dieta humana, y se está usando la biotecnología para producir cultivos que cumplan estos requisitos dietéticos. Un ejemplo importante de esto es la producción de «arroz dorado» con niveles incrementados de β-caroteno, un precursor de la vitamina A (Figura 22.3). En este caso, se introdujeron tres genes que codifican enzimas de la ruta biosintética que conduce a la síntesis de carotenoides en el genoma de arroz usando métodos de la tecnología del DNA recombinante. Dos de estos genes provienen del narciso, y uno es bacteriano. La deficiencia en vitamina A se da en muchas áreas de Asia y de África, y cada año más de 500.000 niños adquieren ceguera permanente debido a esta deficiencia.

Actualmente se están realizando ensayos de campo con el arroz dorado, y el año 2006 debería estar disponible para ser sembrado por los agricultores. Otros trabajos están dirigidos a incrementar los niveles de ácidos grasos, de antioxidantes y de otras vitaminas y minerales ya presentes en las plantas de cultivo. Estos esfuerzos están dirigidos a solucionar las carencias dietéticas que afectan a más del 40 por ciento de la población mundial. Todavía más importante, la idea de que pueden cultivarse plantas por motivos de salud además de como alimento está cambiando nuestro punto de vista sobre la agricultura. Como se discute posteriormente, esta idea se extiende a la producción de proteínas humanas en plantas, de anticuerpos y de vacunas.



FIGURA 22.3 Fotografía de arroz dorado, una cepa genéticamente modificada para producir b-caroteno, un precursor de la vitamina A. Muchos niños en países en los que el arroz es un alimento básico tienen dietas deficientes en vitamina A y desarrollan ceguera.

Inquietudes sobre los organismos modificados genéticamente

La mayoría de los productos modificados genéticamente contienen un gen introducido que codifica una proteína que confiere el carácter deseado (resistencia a herbicida, a insectos, etc.). La mayor parte de las preocupaciones sobre las plantas genéticamente modificadas se centra en su seguridad y en las consecuencias medioambientales. ¿Es seguro comer plantas modificadas genéticamente? En general, si las proteínas no son tóxicas ni alérgicas y no tienen ningún otro efecto fisiológico negativo, no se considera que representen un peligro significativo para la salud. En el caso de las plantas comestibles que contienen el gen EPSP de resistencia a un herbicida, su proteína se degrada rápidamente en los fluidos digestivos, no es tóxica en ratones en dosis millares de veces superiores a las de cualquier exposición humana, y no tiene ninguna similitud de secuencia con toxinas proteicas ni con proteínas alergénicas. En los EEUU y en Europa las agencias gubernamentales apropiadas están desarrollando regulaciones de vigilancia usando métodos estandarizados para evaluar las proteínas en los alimentos genéticamente modificados. En Europa, es obligatorio etiquetar la comida que contiene ingredientes genéticamente modificados, pero actualmente este etiquetaje no es obligatorio en los EEUU.

¿Y qué hay de los riesgos medioambientales de las plantas genéticamente modificadas? Los riesgos ambientales incluyen la transferencia génica por cruzamientos con plantas silvestres, la toxicidad y la capacidad de invasión de las plantas modificadas, lo que resulta en la pérdida de las especies naturales (pérdida de biodiversidad). De hecho, estos problemas son los mismos a los que se enfrenta la utilización de plantas de cultivo tradicionales, y actualmente no hay ninguna prueba científica de que las plantas de cultivo genéticamente modificadas sean inherentemente diferentes de las no modificadas. Sin embargo, puesto que la tecnología de transferencia génica es más sofisticada y se transfieren múltiples caracteres, se pueden generar caracteres nuevos o combinaciones de caracteres, por lo que estas plantas pueden precisar procedimientos de gestión específicos.

Las plantas importantes en agricultura y los animales de ganadería se domesticaron hace unos 10.000 años, y desde entonces estos organismos se han estado modificando genéticamente mediante cruces selectivos, produciendo la diversidad de plantas y animales domésticos que tenemos en la actualidad. La biotecnología ha cambiado la velocidad a la que se pueden desarrollar nuevas plantas y animales y, al permitir la transferencia génica entre especies, ha alterado el tipo de cambios que pueden hacerse. Sin embargo, a diferencia de los programas de cruces selectivos, que han introducido miles de cepas genéticamente alteradas, la biotecnología ha suscitado la preocupación sobre la liberación de organismos genética-

mente modificados al medio ambiente y sobre la seguridad de comer estos productos. Si la biotecnología va a lograr una nueva revolución verde, estas inquietudes deben abordarse desde una investigación prudente y la educación de las personas.

22.2 Los organismos genéticamente alterados sintetizan productos farmacéuticos

El primer producto génico humano manufacturado utilizando DNA recombinante y con licencia para usos terapéuticos fue la insulina humana, disponible desde 1982. La insulina es una hormona proteica que regula el metabolismo de la glucosa. Las personas que no pueden producir insulina tienen diabetes, una enfermedad que en su forma más grave (tipo I) afecta a más de 2 millones de personas en los Estados Unidos.

Unos grupos de células pancreáticas sintetizan un péptido precursor conocido como preproinsulina. Cuando la célula secreta este polipéptido, se cortan aminoácidos del extremo y del medio de la cadena. Esto produce la molécula de insulina madura, que contiene dos cadenas polipeptídicas (las cadenas *A* y *B*) unidas por puentes disulfuro. La insulina circulante en el torrente sanguíneo regula la incorporación de glucosa. Los diabéticos no pueden producir suficiente insulina y deben tomar insulina como medicación.

Producción de insulina en bacterias

Aunque actualmente la insulina sintética humana se produce de otra manera, el método original es instructivo y muestra las posibilidades y las dificultades de la tecnología del DNA recombinante. Una molécula funcional de insulina contiene dos cadenas polipeptídicas, la *A* y la *B*. La subunidad *A* tiene 21 aminoácidos, y la subunidad *B* 30. En el proceso bacteriano original, se construyeron genes sintéticos de las subunidades *A* y *B* mediante síntesis de oligonucleótidos (63 nucleótidos para el polipéptido *A* y 90 para el *B*). Cada oligonucleótido sintético se insertó en un vector en una posición adyacente al gen que codifica la forma bacteriana de la enzima β-galactosidasa. Cuando se transferían a un huésped bacteriano, el gen *lacZ* y el oligonucleótido sintético adyacente se transcribían y se traducían como una unidad. Este producto, un **polipéptido de fusión**, contenía la secuencia aminoacídica de la β-galactosidasa unida a la secuencia aminoacídica de una de las subunidades de la insulina (Figura 22.4). Las proteínas de fusión se purificaban de los extractos bacterianos y se trataban con bromuro

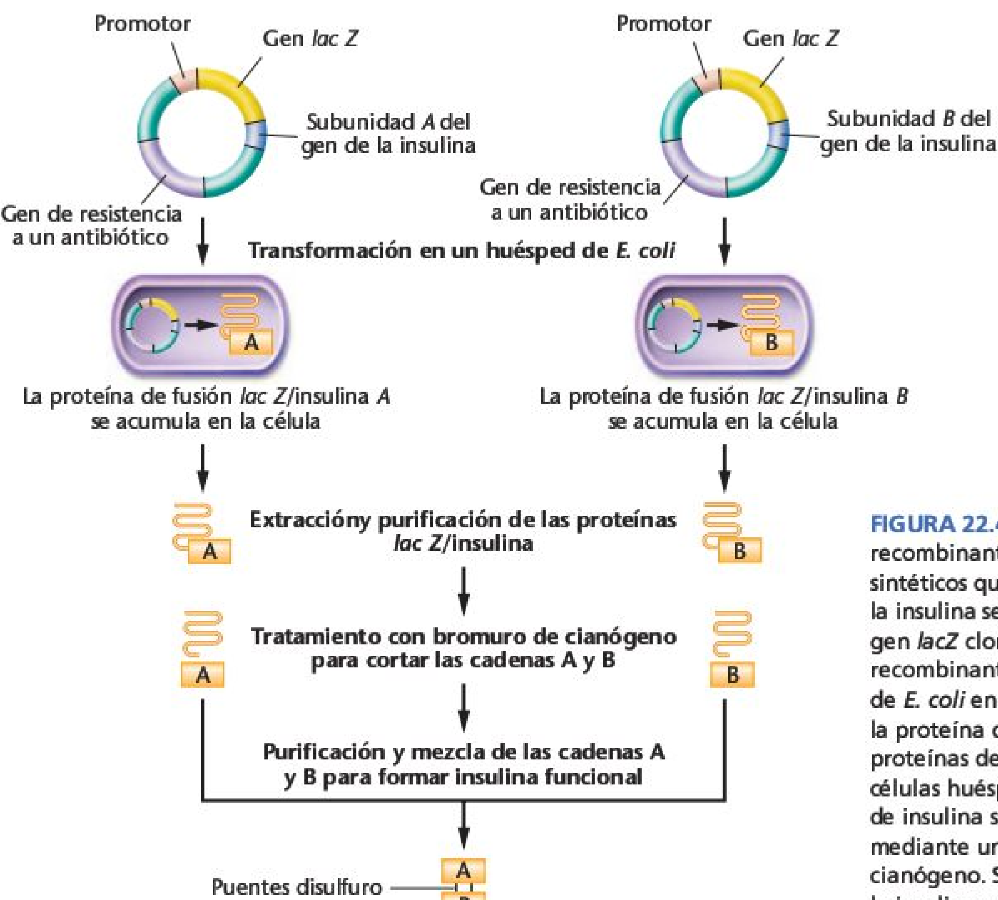


FIGURA 22.4 Para sintetizar insulina recombinante humana, oligonucleótidos sintéticos que codifican las cadenas *A* y *B* de la insulina se insertaron en el extremo del gen *lacZ* clonado de *E. coli*. Los plásmidos recombinantes se transfirieron a huéspedes de *E. coli* en los que se sintetizó y se acumuló la proteína de fusión β-gal/insulina. Las proteínas de fusión se extrajeron de las células huésped y se purificaron. Las cadenas de insulina se liberaron de la β-galactosidasa mediante un tratamiento con bromuro de cianógeno. Se purificaron las subunidades de la insulina y se mezclaron para producir moléculas funcionales de insulina.

de cianógeno, un producto químico que separa la proteína de fusión de la β-galactosidasa. Las dos subunidades de insulina se produjeron y se purificaron mediante este proceso. Cuando se mezclan, las dos subunidades se unen espontáneamente, formando una molécula de insulina intacta y activa. Entonces se envasaba la insulina purificada para que pudiese ser usada por los diabéticos.

Se han producido diversas proteínas manipuladas genéticamente para usos terapéuticos por métodos parecidos (Tabla 22.1). En muchos casos, estas proteínas humanas se producen clonando el gen humano en un vector plasmídico e insertando la construcción en un huésped bacteriano. Después de asegurarse de que el gen transferido se expresa, se producen grandes cantidades de la bacteria transformada, y la proteína humana se recupera y se purifica.

Productos farmacéuticos en huéspedes animales transgénicos

Los huéspedes bacterianos se utilizaron para producir la primera generación de proteínas terapéuticas, aunque hay algunos inconvenientes en utilizar huéspedes procarióticos para sintetizar proteínas eucarióticas. Uno de los problemas es que las células bacterianas no pueden procesar correctamente ni modificar muchas de las proteínas eucarióticas. En consecuencia, no pueden añadir los azúcares ni los grupos fosfato que las proteínas necesitan para que su actividad biológica sea completa. Además, a menudo las proteínas eucarióticas producidas en células procarióticas no se pliegan en la configuración tridimensional adecuada y, en consecuencia, son inactivas. Para superar estas dificultades y para incrementar el rendimiento, la segunda generación de métodos usa huéspedes eucarióticos. En vez de ser producidas en células huésped en cultivo, algunas proteínas humanas como la α1-antitripsina se producen en la leche del ganado.

La deficiencia de la enzima α1-antitripsina se asocia con la forma hereditaria del enfisema, una enfermedad respiratoria progresiva y mortal común entre los originarios de Europa. Para producir α1-antitripsina para ser usada en el tratamiento de esta enfermedad, se clonó el gen humano en un vector en un sitio adyacente a una secuencia promotora de DNA de oveja que activa la transcripción en las células productoras de leche. Los genes localizados a continuación de este promotor sólo se expresan en glándulas mamarias. Se microinyectó este gen de fusión en ovocitos de oveja fecundados *in vitro* (Figura 22.5). Las células huevo fecundadas se transfirieron a madres adoptivas. Las ovejas transgénicas resultantes se desarrollaron normalmente y, después de aparearse, produjeron leche que contenía una alta concentración de α1-antitripsina humana funcional. Esta proteína humana está presente en concentraciones de más de 35 gramos por litro de leche, y resulta fácil de extraer y purificar. Un pequeño rebaño de ovejas productoras de leche puede proporcionar con facilidad un suplemento adecuado de esta proteína. Rebaños de otros animales transgénicos funcionando como «fábricas biológicas» se están convirtiendo en parte de la industria farmacéutica. De hecho, la famosa oveja Dolly se clonó para facilitar el establecimiento de un rebaño de ovejas que produjesen de manera consistente altos niveles de proteínas humanas.

Las proteínas humanas producidas en animales transgénicos se someten a pruebas clínicas como el primer paso de su uso terapéutico. Actualmente se está ensayando clínicamente una enzima humana recombinante, la α-glucosidasa, producida en leche de conejo, para tratar niños con el **síndrome de Pompe**. Esta enfermedad metabólica progresiva y mortal es debida a la falta de esta enzima, y se hereda de forma autosómica recesiva. En la enfermedad de Pompe de aparición temprana,

TABLA 22.1 PRODUCTOS FARMACÉUTICOS DISEÑADOS GENÉTICAMENTE YA DISPONIBLES O EN PERÍODO DE ENSAYOS CLÍNICOS

Producto génico	Enfermedad que trata
Factor regulador de sodio atrial	Paro cardíaco, hipertensión
Factor de crecimiento epidérmico	Quemaduras, transplantes de piel
Eritropoyetina	Anemia
Factor VIII	Hemofilia
Interferón gamma	Cáncer
Factor estimulador de colonias de granulocitos	Cáncer
Vacuna de la hepatitis B	Hepatitis
Hormona del crecimiento humana	Enanismo
Insulina	Diabetes
Interleuquina-2	Cáncer
Superóxido dismutasa	Trasplantes
Activador de plasminógeno tisular	Ataque de corazón

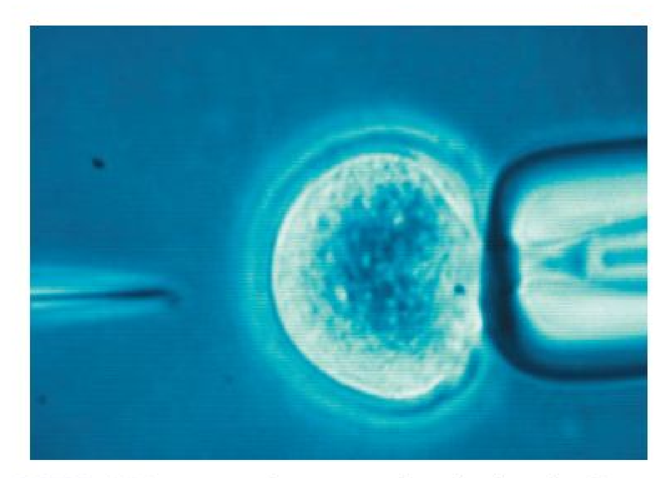


FIGURA 22.5 Para transferir genes clonados al núcleo de un zigoto de mamífero se utiliza una micropipeta. Entonces el zigoto inyectado se transferirá al útero de una madre sustituta para que se desarrolle.

los niños tienen poco tono muscular y puede que nunca puedan sentarse ni estar de pie. La mayoría mueren antes de los 2 años de complicaciones respiratorias o cardíacas. En uno de los primeros ensayos, se suministró esta enzima a niños afectados de manera semanal, sin que se produjesen efectos colaterales significativos. Todos los niños mostraron una actividad enzimática normal en los tejidos analizados y una mejoría de los síntomas. Si los ensayos a gran escala tienen éxito, la α-glucosidasa recombinante obtenida en animales transgénicos se convertirá en el método preferido para tratar esta enfermedad.

Plantas transgénicas y vacunas comestibles

Una de las aplicaciones potencialmente más valiosas de la tecnología del DNA recombinante es la producción de vacunas. Las vacunas estimulan al sistema inmunitario para que produzca anticuerpos contra los organismos causantes de enfermedades, lo que confiere inmunidad contra estas enfermedades. Generalmente se utilizan dos tipos de vacunas: vacunas inactivadas, preparadas de muestras de virus o bacterias infecciosas muertas; y vacunas atenuadas, que son virus o bacterias vivos que no pueden reproducirse pero que pueden provocar una forma no grave de la enfermedad.

Utilizando la tecnología del DNA recombinante se está produciendo un nuevo tipo de vacunas denominadas vacunas de subunidad, que consisten en una o más proteínas de superficie de virus o de bacterias. Esta proteína de superficie actúa como antígeno para estimular el sistema inmunitario para que haga anticuerpos contra el virus o la bacteria. Una de las primeras vacunas de subunidad se hizo contra la hepatitis B, un virus que provoca daños en el hígado y cáncer. El gen que codifica la proteína de superficie del virus de la hepatitis B se clonó en un vector de expresión de levadura y se produjo en células huésped de levadura. Esta proteína se extrae y se purifica de las células huésped, y se envasa para su utilización como vacuna.

Las vacunas de subunidad producidas mediante biotecnología proporcionan una fuente para fabricar vacunas puras bajo condiciones controladas, y se usa de manera extensa. Sin embargo, los programas de vacunación en los países en vías de desarrollo se enfrontan a problemas graves de producción, transporte y almacenamiento. La mayoría de las vacunas necesitan refrigeración y deben ser inyectadas en condiciones estériles. En las áreas rurales de muchos países no se dispone de medios de refrigeración ni para la esterilización de instrumentos. Para solucionar estos problemas, la biotecnología está desarrollando vacunas baratas sintetizadas en plantas comestibles. La producción de estas vacunas es económica, y no debes suministrarse en condiciones estériles por personal médico.

Como sistema modelo, el gen que codifica la subunidad antigénica de la vacuna de la hepatitis B se ha transferido a una planta de tabaco y se ha expresado en sus hojas (Figura 22.6). Para que pueda ser usado como una fuente de vacuna, el gen debería insertarse en una planta comestible como una gramínea o una verdura. Otras vacunas comestibles se encuentran en la fase de ensayos clínicos. Se ha producido una vacuna contra la bacteria que causa diarrea en patatas genéticamente modificadas (Figura 22.7), y se ha usado para vacunar con éxito voluntarios humanos que comieron pequeñas cantidades de estas patatas (50-100 g). (*Véase* el ensayo de Genética, tecnología y sociedad del Capítulo 6.) En ensayos con otras vacunas, un grupo de voluntarios comió espinacas transgénicas que expresaban antígenos víricos de la rabia. Ocho de los 14 voluntarios mostraron un incremento significativo en anticuerpos específicos contra la rabia. Actualmente se están realizando ensayos con bananas que producen vacunas. Estos ensayos iniciales establecen que las vacunas comestibles son factibles. El éxito de estas pruebas significa que pronto habrá plantas comestibles genéticamente modificadas para vacunar bebés, niños y adultos contra muchas enfermedades infecciosas.



FIGURA 22.6 Se han generado hojas de tabaco que contienen una subunidad antigénica antígeno del virus de la hepatitis B. Las hojas de las plantas transgénicas se han tratado con anticuerpos contra el antígeno de la hepatitis B, y se han teñido para mostrar que las plantas producen el antígeno. La hoja central de la fotografía proviene de una planta de tabaco normal, y no está teñida. En estos experimentos se usan plantas de tabaco porque son un organismo experimental común en biología molecular de plantas. Para utilizarse como vacuna, la subunidad antigénica debería transferirse a una planta de cultivo comestible.

Ahora resuelva esto

El Problema 22.4 de la página 670 le pide que interprete unos datos sobre el desarrollo de una vacuna comestible.

Sugerencia: El desarrollo de un anticuerpo por la porción más pequeña posible de una proteína es importante para asegurar la especificidad de la vacuna.

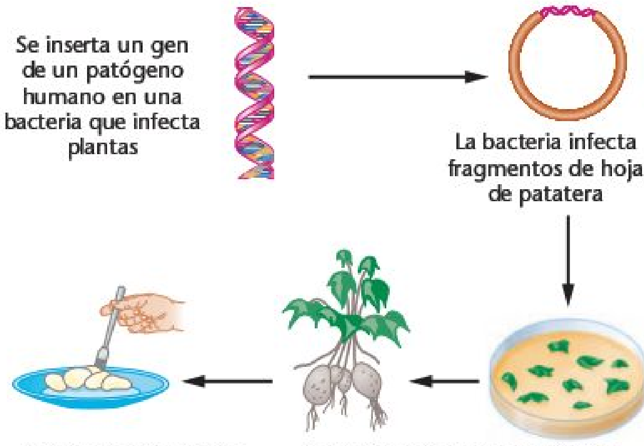


FIGURA 22.7 Para hacer una vacuna comestible, se transfiere un gen de un patógeno (un agente que cause una enfermedad, como un virus o una bacteria) a un vector, y entonces a un huésped bacteriano que infecte células vegetales. La infección de hojas de la patatera transfiere el vector y el gen del patógeno al núcleo de las células de la hoja. Se hace que fragmentos de la hoja se desarrollen en pataderas maduras que expresen el gen patogénico. La ingestión de la patata cruda dispara una respuesta inmunitaria contra la proteína codificada por el gen del patógeno, confiriendo inmunidad a la infección de este patógeno.

22.3 La biotecnología se usa para diagnosticar y rastrear enfermedades genéticas

Muchas enfermedades genéticas se pueden diagnosticar en estadios prenatales usando la biotecnología. Los métodos más ampliamente utilizados de detección prenatal de enfermedades genéticas son la amniocentesis y la extracción de vellosidades coriónicas (CVS, del inglés *chorionic villus sampling*). En la amniocentesis, se utiliza una aguja para extraer fluido amniótico (Figura 22.8), y el fluido y las células que éste contiene se analizan para detectar enfermedades cromosómicas y genéticas. En la CVS, se inserta un catéter en el útero y se utiliza para retirar una pequeña muestra de tejido del corion fetal. Entonces se utiliza este tejido para realizar análisis citogenéticos, bioquímicos y basados en DNA recombinante.

Cuando se empareja con estos métodos de obtención de muestras, la biotecnología es una herramienta muy sensible y fiable para la detección prenatal de enfermedades genéticas. En las pruebas prenatales se pueden examinar directamente el genotipo fetal, en vez de usar los pocos análisis disponibles para productos génicos normales y mutantes. Esta capacidad es especialmente importante por que con frecuencia los productos génicos no pueden ser detectados antes del nacimiento, incluso cuando hay métodos de análisis disponibles. Por ejemplo, los defectos en la proteína la β-globina adulta no se pueden detectar en estadios prenatales porque el gen de la β-globina no se expresa hasta unos días después del nacimiento.

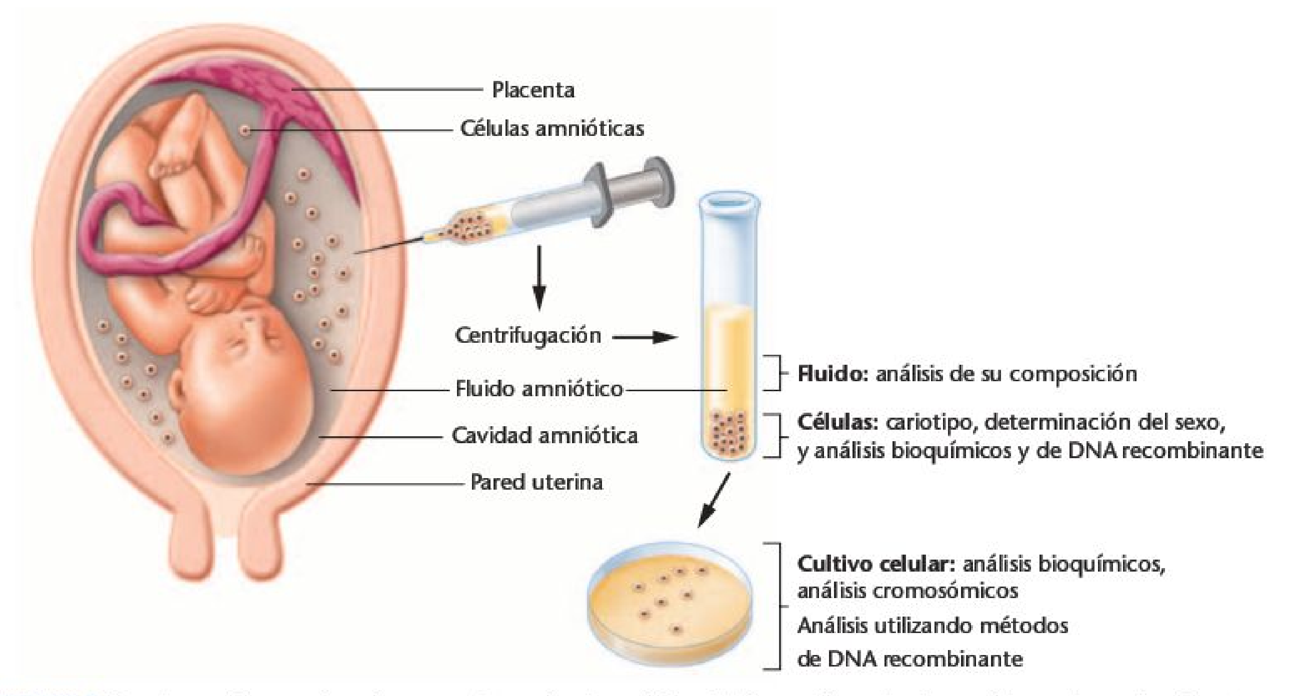


FIGURA 22.8 Para la amniocentesis, primero se determina la posición del feto utilizando ultrasonidos, y después se inserta una aguja por la pared abdominal y por la uterina para recuperar fluido y células fetales para análisis citogenéticos y/o bioquímicos.

Diagnóstico prenatal de la anemia falciforme

La anemia falciforme es una enfermedad autosómica recesiva común en personas que tienen su origen familiar en áreas de África Occidental, la cuenca del Mediterráneo y algunas partes de la India. La anemia falciforme se debe a una sustitución de un solo aminoácido en el gen de la β-globina. Este cambio se debe a la sustitución de un solo nucleótido, que elimina un sitio de corte para las enzimas de restricción *Mst*II y *Cvn*I. En consecuencia, esta mutación altera el patrón de fragmentos de restricción obtenido mediante la transferencia de Southern. Estas diferencias en los sitios de corte de restricción se usan para el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme, y para establecer el genotipo de los padres y de otros miembros de la familia que pueden ser heterocigotos portadores de esta condición. Para el diagnóstico prenatal, se obtienen células fetales por amniocentesis o por CVS; para el análisis de los familiares, se recoge una muestra de sangre. Se extrae el DNA de las muestras y se digiere con *Mst*II. Esta enzima produce tres cortes en el gen de la β-globina normal, produciendo dos fragmentos pequeños de DNA. En el alelo mutante, el segundo sitio para *Mst*II queda alterado por la mutación, produciéndose un solo fragmento de restricción más largo tras la digestión con esta enzima (Figura 22.9). Los fragmentos de DNA digeridos con enzimas de restricción se separan por electroforesis en gel, se transfieren a membranas de nylon y se visualizan por hibridación de la transferencia de Southern.

En la Figura 22.9 se muestra el resultado de un análisis genético de anemia falciforme en una familia. Los padres (I-1 y I-2) son heterocigotos para la mutación. La digestión del DNA de cada progenitor con *Mst*II produce una banda grande (el alelo mutante) y dos bandas más pequeñas (el alelo normal). Su primera hija (II-1) es homocigota normal ya que solo presenta dos bandas pequeñas. El segundo hijo (II-2) tiene anemia falciforme; presenta una sola banda grande, por lo que es homocigoto para el alelo mutante. El feto (II-3) presenta una banda grande y dos bandas pequeñas, y por lo tanto es heterocigoto para la anemia falciforme. El o ella no sufrirá la enfermedad, pero será portador.

Ahora resuelva esto

El Problema 22.4 de la página 670 utiliza análisis de RFLP para determinar si en una familia unas hermanas son portadoras de hemofilia.

Sugerencia: Las diferencias en el número y la localización de los sitios para enzimas de restricción generan RFLPs que se pueden usar para determinar los genotipos. En este problema, estas diferencias son clave para analizar los genotipos.

Solo del 5 al 10 por ciento de todas las mutaciones puntuales pueden detectarse por análisis de restricción. Sin embargo, si un gen mutante está bien caracterizado y se ha secuenciado la región mutada, se pueden usar oligonucleótidos sintéticos como sondas para detectar los alelos mutantes.

Polimorfismos de un solo nucleótido y rastreo genético

Las sondas sintéticas denominadas **oligonucleótidos específico de alelo** (**ASO**, del inglés *allele-specific oligonucleotide*) pueden identificar alelos que difieren en tan solo un nucleótido. En comparación con el análisis de restricción, que se limita a los casos en que una mutación cambia un sitio de restricción, los ASO detectan cualquier tipo de cambio de un solo nucleótido, incluyendo aquellos que no afectan al sitio de corte de una enzima de restricción. En consecuencia, este método ofrece una

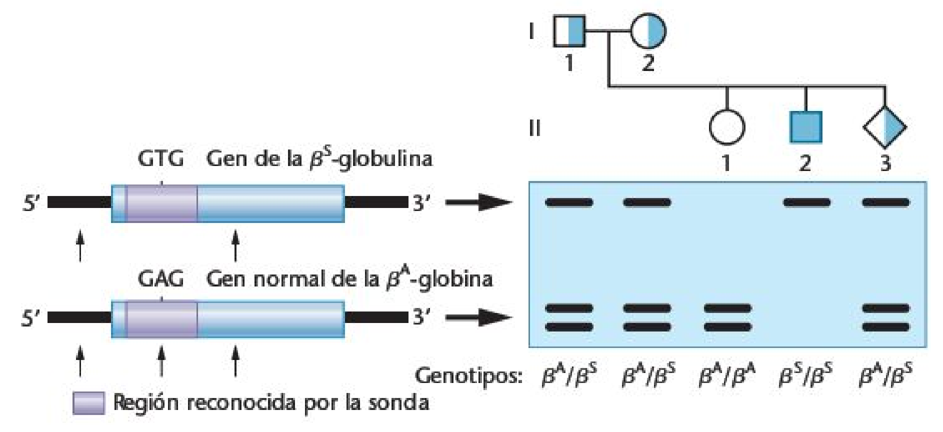


FIGURA 22.9 Diagnóstico por transferencia de Southern de la anemia falciforme. Las flechas indican la localización de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. En el alelo mutante de la β-globina (β^S), una mutación puntual (GAG → GTG) ha destruido un sitio de corte de una enzima de restricción, lo que resulta en un único fragmento en una transferencia de Southern. En el árbol genealógico, la familia tiene una hija normal homocigota no afectada (II-1), un hijo afectado (II-2) y un feto portador no afectado (II-3). El genotipo de cada miembro de la familia se puede leer directamente e la transferencia y se muestra debajo de cada carril.

mayor resolución y unas aplicaciones más amplias. Bajo las condiciones adecuadas, una ASO hibridará sólo con su secuencia complementaria, y no con otras secuencias aunque éstas varíen en tan solo un nucleótido. Actualmente se dispone de un método que utiliza análisis de ASO y de PCR para rastrear muchas enfermedades, incluyendo la anemia falciforme.

En este método, se extrae DNA, se desnaturaliza en sus cadenas sencillas y se usa para amplificar una región del gen de la β-globina por PCR. Se pone una gota del DNA amplificado en dos filtros, y cada filtro se hibrida con un ASO diferente, una sintetizada a partir de la copia normal del gen de la β-globina y otra a partir de la copia mutante (Figura 22.10). Después de visualizar la hibridación, el genotipo se puede leer directamente de los filtros. Con el ASO para la secuencia normal (Figura 22.10a), el genotipo normal homocigoto (*AA*) produce una mancha oscura (dos copias del alelo normal), y el genotipo heterocigoto (*AS*) produce una mancha más clara (una copia del alelo normal). El genotipo homocigoto para anemia falciforme no hibridará con esta sonda, y no se verá ninguna mancha; utilizando una sonda para el alelo mutante (Figura 22.10b) se obtiene el patrón recíproco. Esta técnica rápida, económica y muy fiable se usa para diagnosticar una amplia gama de enfermedades genéticas causadas por mutaciones puntuales.

Región del gen de la β-globina amplificado por PCR



Se aplica el DNA a filtros e unión, y se hibrida con la sonda ASO

(a) Genotipos *AA* *AS* *SS*

Normal (β^A) ASO: 5′ – CTCCTGAGGAGAAGTCTGC – 3′

(b) Genotipos *AA* *AS* *SS*

Mutante (β^S) ASO: 5′ – CTCCTGTGGAGAAGTCTGC – 3′

FIGURA 22.10 Para determinar un genotipo utilizando oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), el gen de la β-globina se amplifica por PCR utilizando DNA extraído de glóbulos blancos. Se desnaturaliza el DNA amplificado y se aplica en tiras sobre filtros que unen DNA. Se hibrida cada tira con un ASO específico, y tras la hibridación y la exposición se visualiza en una película de rayos X. Si los tres genotipos hibridan con un ASO del alelo de la β-globina normal, se observará el patrón de (a): las personas homocigotas *AA* tienen dos copias del alelo de la β-globina normal y mostrarán una fuerte hibridación; las personas heterocigotas *AS* tienen un alelo de la β-globina normal y un alelo mutante, y mostrarán una hibridación más débil; las personas homocigotas *SS* con anemia falciforme no tienen ninguna copia normal del gen de la β-globina, y no mostrarán hibridación con la sonda ASO para el alelo normal de la β-globina. (b) Los mismos genotipos hibridados con la sonda del alelo de la β-globina de la anemia falciforme mostrarán el patrón recíproco: sin hibridación con el genotipo *AA*, hibridación débil con el heterocigoto (*AS*), y una intensa hibridación con el genotipo homocigoto para anemia falciforme (*SS*).



El Problema 22.23 de la página 671 le pregunta si las secuencias de DNA de los alelos normal y mutante de la anemia falciforme del gen de la β-globina se unirán a un determinado ASO.

Sugerencia: El análisis de ASO se hace en condiciones que sólo permiten la hibridación de secuencias nucleotídicas idénticas al ASO que se encuentren en el filtro. Los emparejamientos erróneos de un solo nucleótido evitan la hibridación.

En los casos en que se conoce la secuencia del alelo normal y en que se ha identificado la naturaleza molecular del alelo mutante, los ASO se sintetizan directamente de las copias normal y mutante del gen, y se usan para rastrear las enfermedades que implican deleciones en vez de mutaciones de un solo nucleótido. En la **fibrosis quística** (**CF**, del inglés *cystic fibrosis*), una deleción denominada Δ508 se encuentra en el 70 por ciento de todas las copias mutantes del gen. La CF es una enfermedad autosómica recesiva asociada a un defecto en una proteína denominada **regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)**, que regula el transporte de iones por la membrana plasmática. Para detectar los heterocigotos portadores de la mutación Δ508 se utilizan oligonucleótidos específicos de alelo hechos por PCR a partir de muestras clonadas de los alelos normal y mutante. Se extrae DNA de glóbulos blancos de los individuos a examinar, se aplica a un filtro de nylon y se hibrida con cada uno de los ASO (Figura 22.11). En los individuos afectados solo hibridará el ASO obtenido del alelo mutante; en los heterocigotos hibridarán ambos ASO; y en los homocigotos normales sólo hibridará el ASO del alelo normal.

La CF afecta aproximadamente a 1 de cada 2.000 personas descendientes del norte de Europa, y el rastreo para CF se puede usar en estas poblaciones para detectar los portadores y realizar consejo genético a estas personas de su estatus respecto la CF. Sin embargo, no se pueden rastrear todas las mutaciones conocidas para este gen (se han identificado más de 1000 mutaciones), por lo que un resultado negativo no elimina una posible condición de portador heterocigoto, y es posible que todavía queden más mutaciones de CF por identificar. En consecuencia, el rastreo para CF no se ha generalizado, pero sin duda será común cuando los análisis cubran el 98 o 99 por ciento de todas las posibles mutaciones de CF.

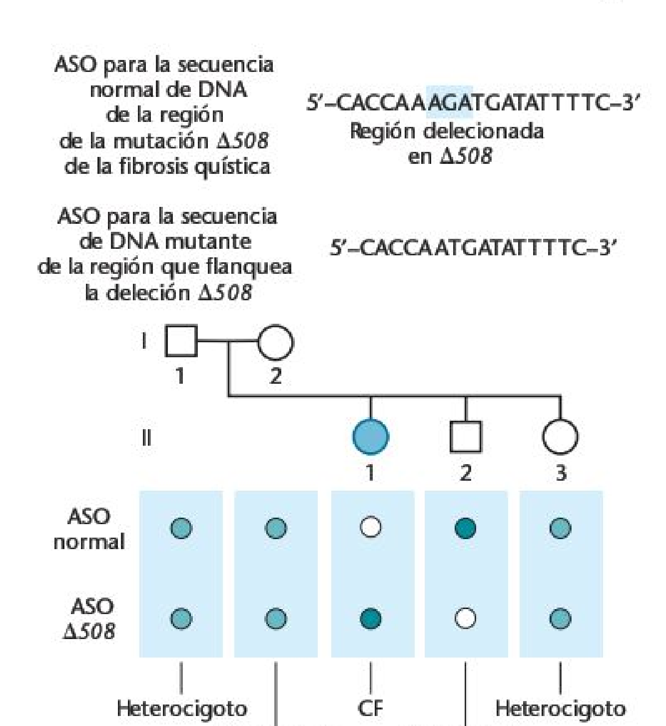


FIGURA 22.11 Los ASO para la región que abarca la mutación más común de la CF (el alelo *Δ508*) se preparan a partir de copias clonadas del alelo normal y del alelo *Δ508*, y entonces se depositan sobre una membrana de unión a DNA. Para el rastreo, se amplifican los alelos CF por PCR, se marcan y se aplican a la membrana. La membrana se hibrida con una mezcla de los dos ASO. Entonces el genotipo de cada miembro de la familia puede leerse directamente del filtro. El DNA de los progenitores (I-1 e I-2) hibrida con ambos ASO, lo que indica que ambos tienen un alelo normal y un alelo mutante, y que por lo tanto son heterocigotos. El DNA de II-1 hibrida sólo con el ASO *Δ508*, lo que indica que este miembro de la familia es homocigoto para la mutación y tiene fibrosis quística. El DNA de II-2 hibrida sólo con el ASO del alelo CF normal, lo que indica que tiene dos alelos normales. El DNA de II-3 hibrida con ambos ASO, y por lo tanto es heterocigoto.

Microordenaciones de DNA

La utilización de nucleótidos específicos de alelo se ha acoplado a la tecnología de la industria de semiconductores para producir **microordenaciones de DNA** (denominados también chips de DNA), que se pueden usar para analizar cientos o miles de genes en un solo ensayo. Las microordenaciones se preparan sobre pequeñas placas de vidrio divididas en áreas muy pequeñas denominadas campos (pequeños cuadrados). Cada campo puede ser tan pequeño como la mitad de un cabello humano. Al vidrio de cada campo se le unen copias de una sonda sintética de DNA de unos 20 nucleótidos de longitud (Figura 22.12). Los campos de la microordenación pueden contener diferentes combinaciones de nucleótidos, y también alelos normales y mutantes de genes específicos. A lo largo de una hilera de campos, entre un campo y el siguiente la secuencia de las sondas sintéticas se diferencia en un solo nucleótido. Por eso es necesario un grupo de cuatro campos (uno para cada nucleótido) para probar el contenido nucleotídico de una posición determinada en una molécula de DNA. La generación actual de chips de DNA puede contener entre 280.000 y 560.000 campos, pero actualmente se están ensayando chips con varios millones de campos.

Para usar una microordenación en un análisis genético, se extrae el DNA de una persona y se amplifican los genes seleccionados por PCR. Los productos de PCR se marcan con uno o más colorantes fluorescentes, se desnaturalizan en cadenas sencillas y se bombean hacia la microordenación. Los fragmentos de PCR con secuencias nucleotídicas que encajen exactamente con la secuencia de una sonda de la microordenación se unirán a ella, y las que no encajen a la perfección con ninguna sonda se lavarán. Entonces la microordenación se rastrea con un láser, lo que provoca que los campos en que se haya producido hibridación emitan fluorescencia, produciendo un patrón de marcas en la microordenación (Figura 22.13). Se analiza el patrón de hibridación con programas de ordenador unidos al sistema, y los datos se pueden presentar de diversas formas.

Las microordenaciones de DNA se usan para rastrear mutaciones en el gen *p53*, presente en el 60 por ciento de todos

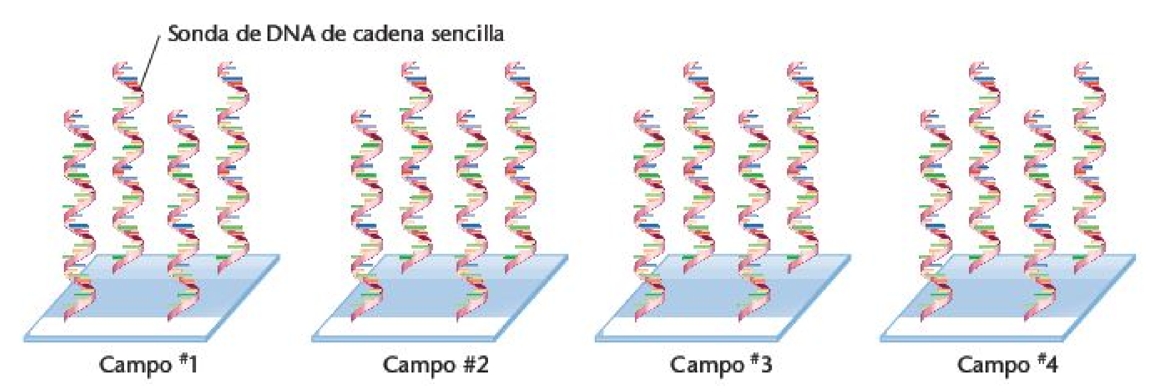


FIGURA 22.12 Para hacer una microordenación de DNA, se unen a un sustrato de vidrio moléculas cortas de DNA de cadena sencilla, de 15 a 30 pares de bases. Cada grupo de moléculas idénticas ocupa un área conocida como campo de la microordenación. Cada campo tiene una anchura aproximado de medio cabello humano.

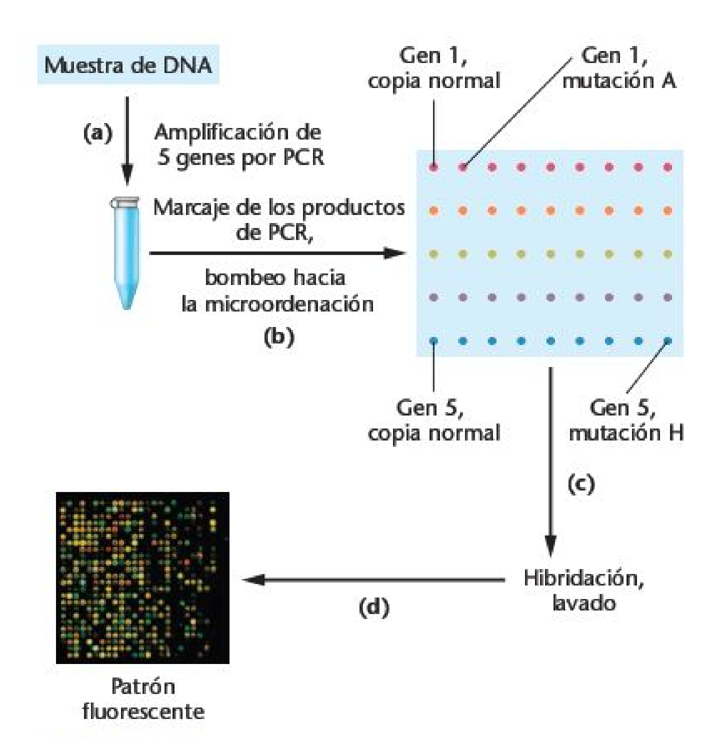


FIGURA 22.13 En una microordenación de DNA, el DNA extraído de una muestra sanguínea se amplifica por PCR. (a) En este ejemplo se usan cebadores para cinco genes. (b) La microordenación contiene sondas de cadena sencilla para el alelo normal de cada uno de los genes (columna 1) y ocho alelos mutantes de cada uno de ellos; 1 fila = 1 gen. (c) Los productos de PCR de cadena sencilla se marcan con colorantes fluorescentes y se bombean hacia la microordenación. (d) La hibridación resultante se revela mediante el patrón de colores de las manchas de la microordenación. La mutación de cada gen se ha designado arbitrariamente con las letras de A a H.

los cánceres, y para rastrear mutaciones en el gen *BRCA1*, que predispone a las mujeres al cáncer de mama. Además, para analizar mutaciones en genes individuales, los chips de DNA se pueden hacer de tal manera que rastreen miles de genes que se crea que están implicados en las enfermedades que muestran un patrón de herencia multifactorial o que surgen tras diversos sucesos de mutación. Por ejemplo, las microordenaciones se usan para analizar los patrones de expresión génica en el diagnóstico del cáncer, y en enfermedades complejas como la enfermedad bipolar y la esquizofrenia.

Desarrollo de medicamentos

Muchas formas de cáncer muestran un patrón distintivo de expresión génica que difiere del de las células normales y del de otros tipos de cáncer. En un análisis por microordenación típico, se aísla mRNA de células cancerosas y normales procedentes de un mismo tipo celular. Las poblaciones de mRNA representan todos los genes que se expresan en estas células. Usando la retrotranscriptasa, el mRNA de cada uno de los tipos celulares se convierte en cDNA, y se marca con un colorante fluorescente. El cDNA de las células normales se marca con un colorante fluorescente determinado (p.e. de color verde); el cDNA de las células cancerosas se marca con otro tipo de colorante fluorescente (p.e. de color rojo). Se mezclan los cDNA marcados y se bombean a través de una microordenación de DNA que contiene sondas que representan los genes que se expresan en ambos tipos de células, las normales y las cancerosas. Los cDNAs se unen a las sondas complementarias de DNA de cadena sencilla del chip, pero no a los otros DNAs. Tras lavar los cDNAs no unidos, se rastrea la micoordenación con un láser, y el patrón de hibridación muestra una serie de manchas de colores, correspondiendo cada mancha a un campo de la microordenación.

Las manchas verdes de la micoordenación representan genes que se expresan sólo en las células normales. Las manchas rojas representan genes que sólo se expresan en las células cancerosas. Las sondas que se unen a cDNAs de ambos tipos de células producirán manchas amarillas (la combinación de rojo y verde). En la práctica, algunas sondas se unen a cDNAs de uno de los tipos celulares, algunas se unos a los del otro tipo celular, y algunas se unen los de ambos, produciendo manchas cuyos colores varían del rojo al verde (Figura 22.14). Los colores distintos al rojo y al verde representan cantidades intermedias de unión de los cDNAs de los dos tipos celulares, e indican diferentes niveles de expresión génica en la célula normal y la cancerosa.

Los genes que se expresan solo en las células cancerosas representan dianas para el desarrollo de medicamentos que interfieran con la acción de las proteínas que codifican, y también para el desarrollo de medicamentos que inhiban la transcripción de los genes cancerosos específicos de estas células. Puesto que a menudo formas diferentes de un mismo cáncer tienen patro-

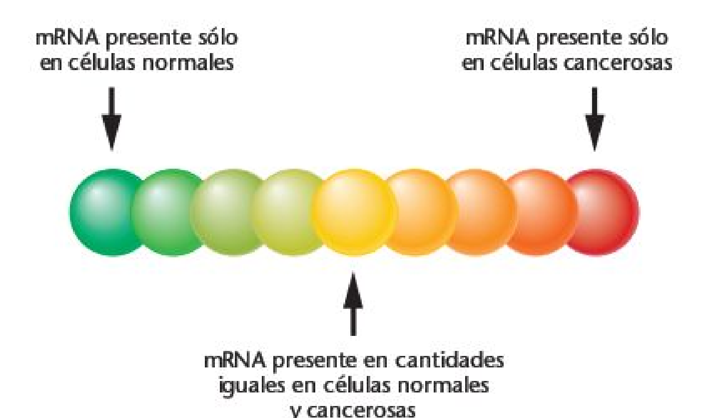


FIGURA 22.14 El color de las manchas en una microordenación de DNA representa niveles de expresión génica. Las manchas verdes representan genes que se expresan en un tipo celular (p.e., las células normales), y las manchas rojas representan genes que se expresan en el otro tipo celular (p.e. células cancerosas). Los colores intermedios representan diferentes niveles de expresión del mismo gen en los dos tipos celulares.

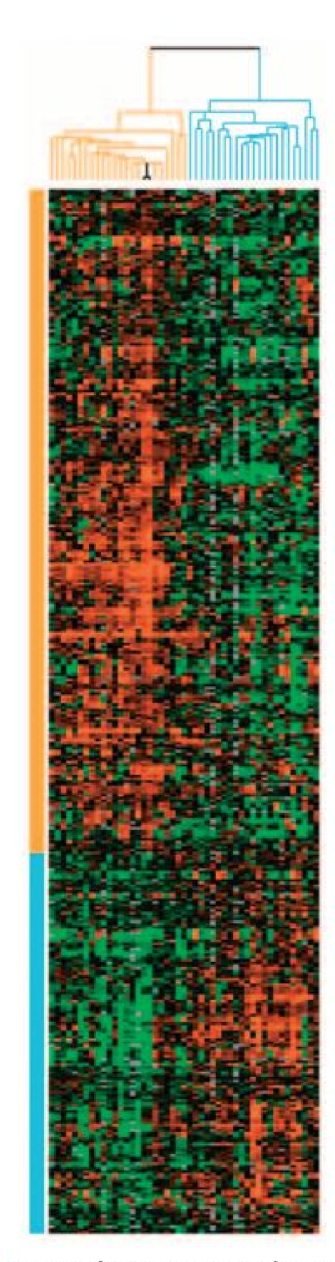


FIGURA 22.15 Este análisis por microordenación muestra el perfil de 18.000 genes expresados en linfocitos normales y cancerosos. El análisis se repitió para cubrir 1,8 millones de análisis individuales de expresión génica. Las células malignas cayeron en dos grupos. El grupo naranja contiene células con perfiles de expresión para células DLBCL GC de tipo B. El grupo azul contiene células con perfiles de expresión para células DLBCL de tipo B activadas. Las células dentro de cada grupo (que se muestran en la parte superior de la figura) se agrupan en función de la similitud de sus patrones de expresión. Cuanto más se parecen sus perfiles de expresión, más estrechamente relacionadas se encuentran. Los colores representan la relación de la expresión génica relativa comparada con células control normales. El color rojo representa niveles de expresión superiores al nivel medio de los controles, el color verde representa niveles de expresión inferiores al nivel medio de los controles, y la intensidad del color representa la magnitud de la diferencia de la media.

nes de expresión génica característicos diferentes, el análisis de microordenaciones también se puede usar para diseñar un programa individualizado de terapia para el cáncer.

Diagnóstico de enfermedades

Usando una microordenación que contenía 18.000 sondas que representaban los genes expresados durante el desarrollo de glóbulos blancos normales y cancerosos, Ash Allzadeh y sus colaboradores utilizaron cDNA para analizar la expresión génica de un tipo de **linfoma no Hodgkin** (un cáncer que afecta los glóbulos blancos). Aproximadamente un 40 por ciento de los pacientes tienen una forma agresiva de esta cáncer denominada **linfoma de células B grandes difusas** (**DLBCL**, del inglés *diffuse large B-cell lymphoma*). Aproximadamente el 40 por ciento de los pacientes en DLBCL responden bien a la quimioterapia y presenten periodos largos de supervivencia. El otro 60 por ciento no responde a la quimioterapia y muere al poco tiempo. Basándose en casi 1,8 millones de medidas de patrones de expresión génica de los 18.000 genes de células normales y cancerosas, Allzadeh y su equipo descubrieron que hay dos tipos celulares diferentes en el DLBLC, con patrones de expresión casi opuestos (Figura 22.15). Uno de estos tipos celulares, denominado células GC de tipo B, tiene un patrón de expresión similar al de las células B en desarrollo que se encuentran en las glándulas linfoides. El segundo tipo celular, denominado células activadas de tipo B, tienen un patrón de expresión parecido al de las células B maduras que ya han dejado las glándulas linfoides y se han trasladado al sistema circulatorio.

La gráfica que representa la supervivencia de los pacientes respecto a los patrones de expresión muestra que los pacientes con el patrón de células activadas de tipo B tenían una tasa de supervivencia mucho más baja (Figura 22.16). Concluyeron que

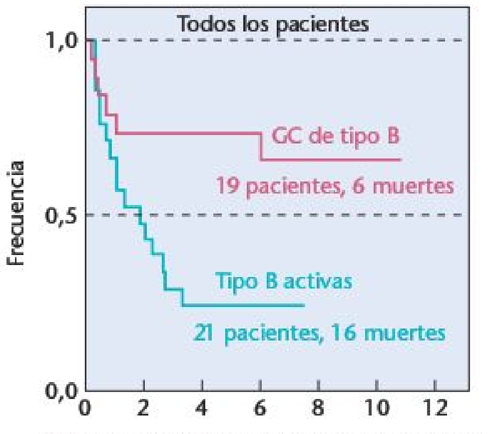


FIGURA 22.16 Gráfico que clasifica los pacientes según el perfil de expresión génica y la probabilidad de supervivencia. Aquellos que tienen un perfil de células de tipo B activas presentan un a tasa de mortalidad muy superior (16 de 21) que los que tienen un perfil de células GC de tipo B (6 de 19).

el DLCBL son en realidad dos enfermedades diferentes con distintos resultados. Las diferencias en los patrones de expresión génica se están usando para diagnosticar estas dos formas de la enfermedad y para desarrollar un programa de quimioterapia específico para cada tipo de cáncer. La utilización de microordenaciones ha revolucionado tanto el diagnóstico como el tratamiento de estas enfermedades.

Rastreo genómico

También se han desarrollado micoordenaciones de DNA que contienen todos los genes del genoma humano (Figura 22.17). La utilización de estas microordenaciones, que se denominada **rastreo genómico**, permite analizar el DNA de una persona en busca de docenas o de centenares de alelos de enfermedades, incluyendo los que predisponen a los ataques de corazón, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y a otros subtipos de enfermedades genéticamente definidas. El rastreo genómico permite rastrear el genoma de una persona y definir el riesgo a padecer una enfermedad específica años o décadas antes de que ésta se manifieste. Aunque el rastreo genómico es caro, se espera que los costes se rebajen rápidamente, y se prevé que en pocos años se encuentre disponible de manera generalizada y que ayude a cambiar los diagnósticos médicos. Quizás durante las décadas venideras se rastrearán todos los recién nacidos para determinar los riesgos para enfermedades genéticas.

Ensayos genéticos y dilemas éticos

Hemos considerado ejemplos de diagnóstico prenatal, de rastreo de heterocigosidad de adultos para enfermedades recesivas sencillas y de rastreo genómico. La utilización de todas estas tecnologías presenta diversos grados de problemas éticos. El rastreo genómico puede predecir el riesgo de una persona a padecer enfermedades durante su vida, lo que representa identificar personas que en el momento del análisis están sanas pero que presentan un alto riesgo de padecer una enfermedad genética en el futuro, incluyendo muchas enfermedades que no desarrollará durante muchos años. Estos avances afectarán de manera fundamental nuestra salud, los patrones reproductivos y el cuidado médico.



FIGURA 22.17 La primera generación de microordenaciones que contienen 50.000 genes candidatos humanos, denominada GenChip, es comercializada por Affymetrix, Inc. La utilización de estas microordenaciones permite rastrear todo el genoma humano de una vez, catalogando los alelos normales y las variantes que tiene una persona.

La utilización de esta tecnología también suscita temas legales, sociales y éticos que no será fácil resolver. Por ejemplo, ¿qué deberían saber las personas antes de decidir someterse a un rastreo genómico o a un análisis genético para una sola enfermedad? ¿Cómo se puede proteger la información generada por estos análisis? ¿Cómo se puede definir y evitar la discriminación genética? Sabemos que los heterocigotos para la anemia falciforme son más resistentes a la malaria que las personas homocigotas para el alelo normal; este tipo de protección también pude producirse en otras enfermedades. ¿Cómo se pueden mantener los aspectos beneficiosos de algunas mutaciones si luchamos para eliminar sus aspectos destructivos? Algunas mutaciones tienen consecuencias horribles; otras dan pie a nuestra existencia completa como humanos. Se conocen muchas cosas sobre la naturaleza molecular de muchas mutaciones humanas diferentes, pero el conocimiento legal y ético y el consenso van muy retrasados respecto a la comprensión científica. Es esencial que haya un debate público amplio y atento a medida que se explora la utilización de la biotecnología.

Todavía se desconocen muchos de los riesgos y de los beneficios potenciales de las pruebas genéticas. Se pueden hacer análisis para muchas enfermedades genéticas para las que no hay tratamientos efectivos que curen o mitiguen sus consecuencias clínicas. ¿Se deben hacer análisis para estas enfermedades? Con la tecnología actual, un resultado negativo no descarta necesariamente el desarrollo futuro de una enfermedad; tampoco un resultado positivo significa que una persona vaya a desarrollar la enfermedad. ¿Cómo se pueden comunicar de manera eficiente los resultados y los riesgos de un análisis genético a las personas analizadas? Las políticas sociales y las leyes sobre los análisis genéticos se están formulando más despacio que la tecnología y el uso de estos análisis. Especialistas en derecho y otros grupos formados por científicos, por profesionales de la salud y de la ética y por consumidores están debatiendo estos temas y formulando opciones de políticas sociales.

22.4 Las enfermedades genéticas se pueden tratar mediante terapia génica

Durante más de dos décadas, se han usado *productos génicos* como la insulina para el tratamiento terapéutico de enfermedades genéticas. Actualmente se están utilizando métodos para transferir *genes* a células de mamífero, desarrollados original-

mente como herramientas de investigación, para tratar enfermedades genéticas, un proceso denominado **terapia génica**. En teoría, la terapia génica transfiere un alelo normal a una célula somática que lleva uno o más alelos mutantes. La expresión del alelo normal resulta en un producto génico funcional cuya acción produce un fenotipo normal.

Métodos de aislamiento y clonación de genes específicos desarrollados originalmente como una herramienta de investigación se están utilizando actualmente para tratar enfermedades genéticas mediante transferencia de alelos normales humanos en un proceso denominado *terapia génica*. Durante décadas se han utilizado algunos productos genéticos, como la insulina, para tratamientos terapéuticos. La terapia génica lleva este proceso un paso más adelante, y persigue modificar el genoma de las células somáticas transfiriendo copias normales de genes para que produzcan cantidades adecuadas del producto génico normal, cuya acción corregiría la enfermedad genética. La expedición de estos genes estructurales y de sus secuencias reguladoras se consigue utilizando vectores o sistemas de transferencia de genes. La entrega de estos genes estructurales y de sus secuencias reguladoras se consigue mediante el uso de vectores o de sistemas de transferencia génica.

En la primera generación de ensayos de terapia génica, el método de transferencia génica más usado utilizaba retrovirus modificados como vectores. Estos vectores se basaban en un virus de ratón denominado virus de la leucemia murina de Maloney (MLV) (Figura 22.18). Este vector se generó eliminando un grupo de tres genes del virus, e insertando un gen humano clonado. Tras empaquetarlo en cubiertas proteicas víricas, el vector recombinante se usaba para infectar las células. Una vez dentro, el virus no se podía replicar a causa de los genes que le faltaban. En la célula, el virus recombinante con el gen humano insertado se transportaba al núcleo y se integraba en un sitio del cromosoma, convirtiéndose en parte del genoma. Si el gen se expresaba, producía un producto génico normal que corregía la mutación presente en el individuo afectado. En los intentos iniciales de terapia génica se trataron diversas enfermedades hereditarias, incluidas la inmunodeficiencia combinada grave (SCID, del inglés *severe combined immunodeficiency*), la hipercolesterolemia familiar y la fibrosis quística. Vamos a examinar el primer intento de usar terapia génica para tratar una niña con SCID, y después repasaremos los ensayos que se están realizando actualmente usando una nueva generación de vectores víricos.

Terapia génica para la inmunodeficiencia combinada grave (SCID)

La terapia génica empezó en 1990 con el tratamiento de una niña llamada Ashanti De Silva (Figura 22.19) que padecía una enfermedad hereditaria denominada inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Las personas afectadas no tienen un sistema inmunitario funcional y normalmente mueren de infecciones leves. Ashanti tenía una forma autosómica de SCID se debe a un defecto en el gen que codifica la enzima **adenosina desaminasa (ADA)**. Su terapia génica empezó con el aislamiento de un tipo glóbulos blancos, denominados células T (Figura 22.20). Estas células, que forman parte del sistema inmunitario, se mezclaron con el vector retrovírico que llevaba una copia del gen *ADA* normal insertada. El virus infectó muchas de las células T, y una copia normal del gen ADA se insertó en el genoma de algunas de ellas. Después de mezclar

FIGURA 22.18 El genoma nativo del MLV de Maloney contiene una secuencia necesaria para la encapsulación, y también genes que codifican las proteínas de la cubierta vírica (*gag*), una DNA polimerasa dependiente de RNA (*pol*) y glucoproteínas de cubierta (*env*). En cada extremo, el genoma está flanqueado por secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) que controlan la transcripción y la integración en el genoma del huésped. El vector SAX mantiene las secuencias LTR y ψ, e incluye un gen de resistencia a neomicina (*neo*^{r}) que se puede usar de marcador de selección. Como se muestra, el vector lleva el gen de la adenosina desaminasa humano clonado (h*ADA*), que está fusionado a una región promotora-intensificadora inicial de SV40. La construcción SAX es típica de vectores retrovíricos usados en terapia génica humana.



FIGURA 22.19 Ashanti De Silva, la primera persona que fue tratada con terapia génica.

Bacteria que contiene el plásmido con el gen *ADA* normal humano clonado

Retrovirus genéticamente discapacitado

El gen *ADA* clonado se incorpora en el virus

Células T aisladas del paciente de SCID

El retrovirus infecta células sanguíneas, y transfiere el gen *ADA* a las células

Se hace crecer a las células en cultivo para comprobar que el gen *ADA* es activo

La células genéticamente modificadas se reimplantan, y producen ADA

FIGURA 22.20 Para tratar la SCID usando terapia génica, se transfiere un gen ADA humano clonado a un vector vírico, que entonces se utiliza para infectar glóbulos blancos extraídos del paciente. El gen *ADA* transferido se incorpora en un cromosoma y se activa. Después de hacer crecer estas células para incrementar su número, éstas se reimplantan en el paciente, donde producen ADA, lo que permite el desarrollo de la respuesta inmunitaria.

estas células con el vector y de producirse la infección, las células T se cultivaron en el laboratorio y se analizaron para asegurar que el gen *ADA* transferido se expresaba. El último paso de esta terapia génica fue la inyección de mil millones de estas células T genéticamente modificadas en su torrente sanguíneo. Algunas de estas células T emigraron hasta la médula ósea de Ashanti, y empezaron a dividirse y a producir ADA. El 25-30 por ciento de las células T de Ashanti expresa la proteína ADA, lo que es suficiente para permitirle llevar una vida normal.

Desgraciadamente, un segundo niño tratado poco tiempo después expresó el gen ADA normal en menos del 1 por ciento de sus glóbulos blancos tras el tratamiento, un nivel que no es suficientemente alto como para ser efectivo. En ensayos posteriores, se intentó transferir el gen ADA a las células de la médula ósea que forman las células T, pero la mayoría de estos intentos no tuvieron éxito. Aunque originalmente la terapia génica se desarrolló para tratar enfermedades debidas a un único gen (monogénicas), esta técnica se adaptó rápidamente para tratar enfermedades adquiridas como el cáncer y enfermedades infecciosas como el HIV. En consecuencia, la mayoría de los tratamientos y ensayos de terapia génica implican estas enfermedades (Figura 22.21a). De hecho, se usa terapia génica para tratar el cáncer más a menudo que cualquier otra enfermedad.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que la terapia génica suministra un gen normal funcional a las células diana?

Además de los vectores retrovíricos, para transferir genes a células humanas también se están usando otros virus y otros métodos (Figura 22.21b). Estos métodos incluyen la utilización de vectores víricos, la transferencia de genes a través de la membrana celular asistida por productos químicos y la fusión de células con vesículas artificiales que contienen secuencias clonadas de DNA.

Problemas y fallos de la terapia génica

En el período de 10 años comprendido entre 1990 y 1999, se realizó transferencia génica a más de 4.000 personas para diversas enfermedades genéticas. A menudo estos ensayos fallaron, lo que condujo a una pérdida de confianza en la terapia génica. Las esperanzas en la terapia génica cayeron todavía más en picado en setiembre de 1999 cuando un adolescente, Jesse Gelsinger, murió durante el tratamiento de terapia génica. Su muerte fue provocada por una respuesta inflamatoria masiva al vector, un adenovirus modificado. (Los adenovirus provocan resfriados e infecciones respiratorias.)

Las perspectivas para la terapia génica volvieron a brillar el año 2000, cuando un grupo de investigadores franceses comunicaron el primer éxito a gran escala de la terapia génica. Tres pacientes con una forma de SCID mortal ligada a X desarrollaron sistemas inmunitarios tras ser tratados con un vector retrovírico que transportaba un gen normal. Este éxito se repitió en tratamientos posteriores en otros diversos pacientes. Sin embargo, posteriormente dos de estos pacientes desarrollaron leucemia. Un análisis de las células cancerosas de estos dos pacientes mostró que el vector retrovírico se había inser-

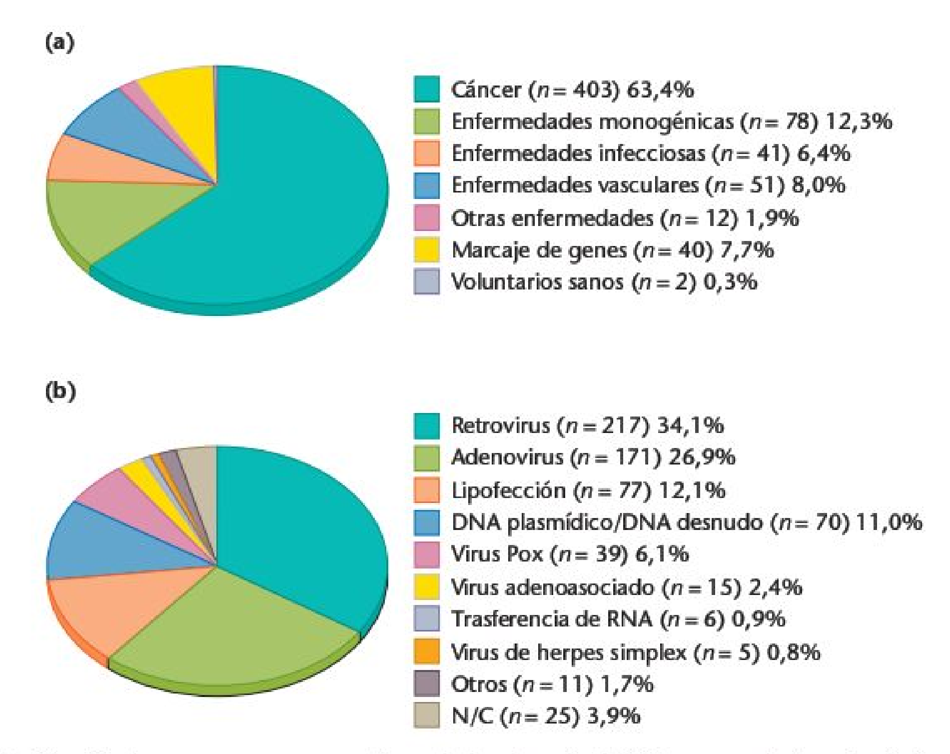


FIGURA 22.21 (a) Gráfico circular que resume, por enfermedades, los más de 630 ensayos de terapia génica que se están realizando en todo el mundo. La mayoría de los ensayos implican el tratamiento del cáncer. (b) Ensayos de terapia génica clasificados según el vector usado. Los retrovirus son los vectores más ampliamente usados, justificando el 34 por ciento del total. Vectores más recientes como los virus adenoasociados solo justifican un pequeño porcentaje de los vectores. N/C = no clasificado.

tado cerca o dentro de un gen denominado *LMO2*. Esta inserción activó *LMO2* provocando una proliferación incontrolada de los glóbulos blancos y el desarrollo de una enfermedad parecida a la leucemia. Otra vez más se analizaron las ideas y los métodos usados en el campo general de la terapia génica para identificar los problemas y desarrollar nuevas estrategias.

El futuro de la terapia génica

La mayor parte de los problemas de la terapia génica son debidos a los vectores. La primera generación de vectores, como el MLV y los adenovirus, tienen varios inconvenientes graves. Primero, la integración del genoma retrovírico (que incluye el gen humano clonado) en el genoma de la célula huésped solo se produce si las células huésped están replicando su DNA. En el cuerpo, en los tipos celulares altamente diferenciados que son diana para la terapia génica, hay muy pocas células que estén replicando su DNA en un momento dado. Segundo, con el tiempo la mayoría de estos vectores víricos causan una respuesta inmunitaria en el paciente, como ocurrió en el caso de Jesse Gelsinger. Tercero, la inserción de genomas víricos en un cromosoma huésped puede inactivar o mutar un gen indispensable, como en el caso de los dos pacientes franceses. Cuarto, los retrovirus tienen una baja capacidad de clonación, y no pueden transportar secuencias insertadas de más de 8 kb. Muchos de los genes humanos exceden este tamaño, incluso eliminando los intrones. Finalmente, es posible que se produzca un virus infeccioso si se produce un suceso de recombinación entre el vector y otros genomas retrovíricos que ya estén presentes en la célula huésped.

Los resultados decepcionantes e incluso mortales de los ensayos de terapia génica usando vectores de primera generación condujeron a una crisis generalizada de confianza en la terapia génica en las comunidades médica y de otros científicos. Para superar estos problemas, se están desarrollando nuevos vectores víricos y nuevas estrategias para la domiciliación celular. En la Tabla 22.2 se resumen las propiedades de los vectores víricos actuales y de los que están en desarrollo. En general, estos vectores caen dentro de dos categorías: los que se integran en el genoma de las células huésped (retrovirus y otros), y los que permanecen en el núcleo pero que no se integran en los cromosomas (virus adenoasociados y otros). Los investigadores esperan que la utilización de nuevos vectores evite varios de los problemas encontrados con los vectores iniciales, y tendrán nuevas características de diseño para permitir la regulación de los sitios de inserción y los niveles de producto génico.

En una aplicación de una de estas nuevas estrategias para la terapia génica, los científicos comunicaron la producción exitosa de la hormona sanguínea eritropoyetina en monos rhesus y en ratones a cuyas células musculares se habían inyectado vectores víricos que transportaban el gen de la eritropoyetina.

TABLA 22.2 **NUEVOS VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA**

Vector	Dianas celulares	Capacidad de clonación	Ventajas	Desventajas
Adenovirus	Pulmón, tracto respiratorio	7,5 kb	Transfección eficiente	Fuerte respuesta inmunitaria
Virus adenoasociado	Fibroblastos, células T, otras	4.5 kb	Transfecta muchos tipos celulares	Pequeño tamaño del inserto
Retrovirus	Células en proliferación	8 kb	Expresión prolongada	Baja eficiencia de transformación
Lentivirus	Células madre, células en proliferación	8 kb	Transfección eficiente	Relacionado al HIV

Estos animales producían la hormona solo cuando recibían el antibiótico rampamicina. Estos resultados son especialmente esperanzadores porque los niveles estimulados de esta hormona son bastante altos, la presencia de DNA foráneo no ha disparado ninguna respuesta inmunitaria, y el gen se puede activar de forma repetida.

Este ensayó utilizó uno de los vectores víricos nuevos más prometedores, un virus adenoasociado (AAV). Este virus entra en las células huésped que no están sintetizando DNA, no se integra en su genoma y su tamaño es muy pequeño, por lo que de manera típica no provoca ninguna respuesta inmunitaria. En los ensayos con eritropoyetina, el vector contenía un promotor de respuesta a rampamicina que se utilizó de conmutador para el gen de la eritropoyetina. Este gen se expresaba sólo cuando las células que contenían el vector se exponían a rampamicina. Se está considerando esta terapia para pacientes que tienen un bajo número de células sanguíneas, como los pacientes con tratamiento de diálisis, los cuales reciben actualmente inyecciones periódicas de la hormona eritropoyetina.

22.5 La terapia génica suscita muchas preocupaciones éticas

La terapia génica suscita diversos problemas éticos, y muchas formas de esta terapia todavía son el origen de intensos debates. En la actualidad, todos los ensayos de terapia génica se restringen a usar células somáticas como dianas para la transferencia génica. Esta forma de terapia génica se denomina **terapia génica somática**; solo afecta a un individuo, y la terapia se realiza con el permiso y el consentimiento informado del paciente. Las directrices éticas para la terapia génica, tal como son en la actualidad, se han revisado y reforzado tras la muerte de Jesse Gelsinger. Este tipo de terapia solo se puede iniciar tras una revisión cuidadosa a diversos niveles de las administraciones, y los ensayos son registrados para proteger los intereses del paciente.

Hay otras dos formas de terapia génica que *no* se han aprobado, básicamente por los problemas éticos todavía no resueltos que conllevan. La primera es la denominada **terapia de la línea germinal**, en la que como diana de la transferencia génica se usan células germinales (las células que originan los gametos, es decir, los espermatozoides y los ovocitos). En esta aproximación, el gen transferido se incorpora en todas las células del cuerpo, incluidas las germinales. Esto significa que las personas de las generaciones futuras también se verán afectadas, sin su consentimiento[3]. ¿Es ético este procedimiento? ¿Tenemos el derecho de tomar esta decisión en nombre de las generaciones futuras? Hasta la fecha, las preocupaciones han superado los beneficios potenciales, y se ha prohibido este tipo de investigación.

La segunda forma no aprobada de terapia génica, que suscita un dilema ético todavía mayor, es la **terapia génica de incremento**, en la que una persona incrementa un carácter deseado. Esta utilización de la terapia génica es extremadamente controvertida y mucha gente se opone a ella con fuerza. ¿Debería usarse la tecnología genética para incrementar el potencial humano? Por ejemplo, ¿debería permitirse el uso de la terapia génica para incrementar la altura, la capacidad atlética o el potencial intelectual? En la actualidad, el consenso es que la terapia de incremento, como la terapia de la línea germinal, es inaceptable. Sin embargo, hay un debate en marcha y muchos de estos temas todavía no están resueltos. Por ejemplo, la Secretaría de Alimentación y Medicamentos de los EEUU (*Food and Drug Administration*) permite actualmente la utilización de hormona de crecimiento producida mediante tecnología de DNA recombinante para incrementar el crecimiento, además de su uso médico actual para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas al crecimiento. Los críticos dicen que la utilización de un producto génico para incrementar caracteres conducirá al uso de la transferencia de genes con el mismo propósito. El resultado de estos debates podría afectar no sólo el destino de las personas si no también la dirección de nuestra sociedad.

---

[3] *Nota del traductor:* de hecho, este tipo de terapia no está diseñada para tratar una persona afectada de una enfermedad genética ya que sus células somáticas no se verán modificadas, si no para que no transmita esta condición a sus futuros descendientes, ya que serán ellos los que heredarán la modificación.

22.6 Los temas éticos son una extensión del Proyecto Genoma Humano

Actualmente los genéticos usan la tecnología del DNA recombinante para identificar genes, diagnosticar enfermedades genéticas, rastrear poblaciones en busca de portadores heterocigotos y tratar enfermedades mediante terapia génica. El conocimiento adquirido con la secuenciación del genoma humano incrementará enormemente el conocimiento de la genética humana, y tendrá un gran impacto en la investigación biomédica y en el cuidado de la salud. Sin embargo, las aplicaciones de estos conocimientos suscitan temas éticos, sociales y legales que se deben identificar, debatir y resolver. A menudo las resoluciones adquieren la fórmula de leyes o de políticas sociales. El debate ético alrededor de la terapia génica discutido en la sección anterior representa un subconjunto de los amplios temas éticos suscitados por los conocimientos adquiridos como resultado del Proyecto Genoma Humano.

El Programa de Implicaciones Éticas, Legales y Sociales (ELSI)

Cuando se discutió el **Proyecto Genoma Humano** (**HGP**) por primera vez, los científicos y el público en general plantearon sus preocupaciones sobre cómo se usaría la información del genoma y sobre cómo se protegerían los intereses tanto de las personas como de la sociedad. Para abordar estas cuestiones, se estableció el **Programa de Implicaciones Éticas, Legales y Sociales (ELSI)** adjunto al Proyecto Genoma Humano. El programa ELSI considera diversos temas, incluyendo el impacto de la información genética sobre las personas, la privacidad y confidencialidad de la información genética, las implicaciones para la práctica médica, el consejo genético y la toma de decisiones reproductivas. Mediante subvenciones de investigación, mesas de trabajo y foros públicos, el programa ELSI formula opiniones políticas para abordar estos temas.

El programa ELSI se centra en cuatro áreas: (1) la privacidad y la imparcialidad en el uso y la interpretación de la información genética; (2) las maneras de transferir el conocimiento genético del laboratorio de investigación a la práctica clínica; (3) las maneras de asegurar que los participantes en las investigaciones genéticas conozcan y entiendan los riesgos y los beneficios potenciales de su participación y den un consentimiento informado; y (4) la educación pública y profesional. Se espera que, a medida que el HGP vaya cambiando de la generación de información sobre las bases genéticas de las enfermedades a la mejora de los tratamientos, a promover la prevención y a desarrollar curas, se identificarán estos y otros temas éticos y se desarrollará un consenso internacional político y legal adecuado.

22.7 El hallazgo y la cartografía de genes en el genoma humano con la tecnología del DNA recombinante

Cuando se cartografiaron las primeras enfermedades genéticas, normalmente el fenotipo esta asociado a un producto génico mutante que podía identificarse en las personas afectadas. Usando la proteína mutada como marcador, se realizaba un análisis genealógico para establecer el patrón de herencia en un pequeño número de casos, para establecer el locus cromosómico del gen. Sin embargo, a parte de los genes del cromosoma X, el avance en la cartografía de genes humanos era muy lento por la falta de marcadores. El progreso real en la cartografía de genes y en la identificación de las proteínas codificadas se ha producido durante las dos últimas décadas. Actualmente, con el cada vez más detallado conocimiento del genoma, se puede cartografiar un gen sin saber nada de su producto.

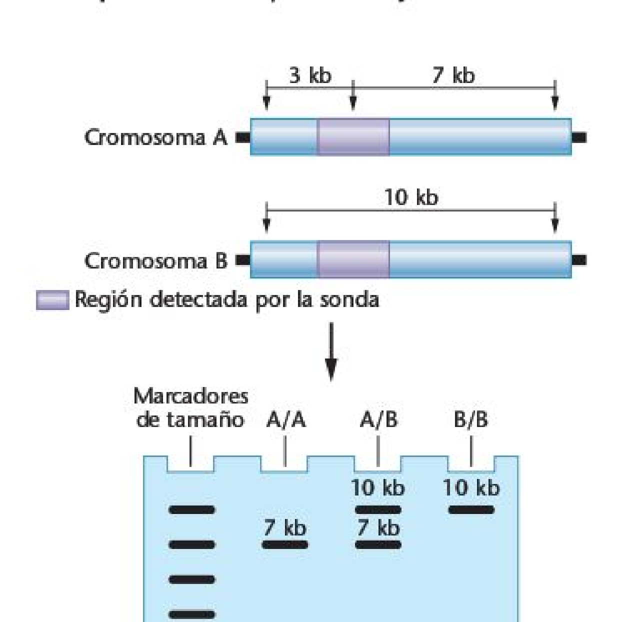
Seminario Web 22.1
Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción

Los RFLP como marcadores genéticos

En todo el genoma humano se encuentran variaciones en las secuencias nucleotídicas (mayoritariamente en las regiones no codificantes), con una frecuencia aproximada de 1 de cada 200 bases. Estos cambios nucleotídicos se producen en sitios específicos y generan sustituciones, deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. A veces estas variaciones pueden generar o destruir sitios de corte de enzimas de restricción. Si un sitio de restricción generado por variación nucleotídica está presente en un cromosoma pero está ausente en su homólogo, se pueden distinguir los dos cromosomas por su patrón de fragmentos de restricción en una transferencia de Southern (Figura 22.22). La región del cromosoma A mostrado en esta figura contiene tres sitios *Bam*HI; su homólogo, el cromosoma B, contiene dos sitios. Cuando el cromosoma A se corta con *Bam*HI, se generan fragmentos de 3 kb y de 7 kb, mientras que cuando se corta el cromosoma *B* se genera un sólo fragmento de 10 kb. Estos fragmentos pueden visualizarse en una transferencia de Southern, utilizando una sonda de esta región cromosómica.

Las variaciones detectables en la longitud de los fragmentos generados al cortar con una enzima de restricción se denominan **polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)**. Los RFLP son muy comunes; en el genoma humano se han detectado varios miles de ellos, y la mayoría se han asignado a regiones cromosómicas concretas. Estas variaciones se pueden detectar en una transferencia de Southern como alelos codominantes, y pueden utilizarse como marcadores para seguir la herencia de enfermedades genéticas de generación en generación en una familia afectada.

Los RFLP se pueden usar para cartografiar el locus cromosómico de una enfermedad genética si el RFLP cosegrega con esta enfermedad en una familia multigeneracional (tres generaciones o más). La selección de qué RFLP usar en una fa-



Genotipos	Tamaño de los fragmentos
Homocigoto para el cromosoma A (A/A)	3, 7 kb
Heterocigoto (A/B)	3, 7, 10 kb
Homocigoto para el cromosoma B (B/B)	10 kb

FIGURA 22.22 Los alelos del cromosoma A y del cromosoma B representan segmentos de DNA de cromosomas homólogos. La región que hibrida con la sonda se muestra en verde; las flechas indican la localización de los sitios de corte de la enzima de restricción que define los alelos. En el cromosoma A, tres sitios de corte generan fragmentos de 7 kb y de 3 kb. En el cromosoma B, sólo hay dos sitios de corte, que generan un fragmento de 10 kb de longitud. La ausencia del sitio de restricción en B podría ser el resultado de una mutación de una base dentro del sitio de reconocimiento/corte de la enzima. Puesto que estas diferencias en los sitios de restricción se heredan de manera codominante, hay tres genotipos posibles: *AA*, *AB*, y *BB*. La combinación alélica que tiene cada individuo puede detectarse por digestión de restricción del DNA genómico (obtenido por ejemplo de una muestra de sangre o de fibroblastos de la piel), seguido por una electroforesis en gel, transferencia a un filtro que une DNA e hibridación con una sonda apropiada. Los patrones de los fragmentos de los tres posibles genotipos se muestran como aparecerían al utilizar la transferencia de Southern.

milia es una cuestión de ensayo y error. Puede ser necesario probar muchos RFLP diferentes para encontrar un grupo para el que la mayoría de los familiares sean heterocigotos. Si los miembros de una familia son heterocigotos para un RFLP asignado a un cromosoma específico, se puede identificar cada miembro del par de cromosomas a analizar ya que el RFLP pasa de generación en generación. Esto proporciona una manera de establecer una relación entre un cromosoma específico (identificado por el RFLP marcador) y el fenotipo de la enfermedad.

Utilización de los RFLP para hacer análisis de ligamiento

Para cartografiar una enfermedad genética, se traza la herencia de un RFLP determinado y de la enfermedad en una familia (Figura 22.23). Si los loci del RFLP y de la enfermedad se en-

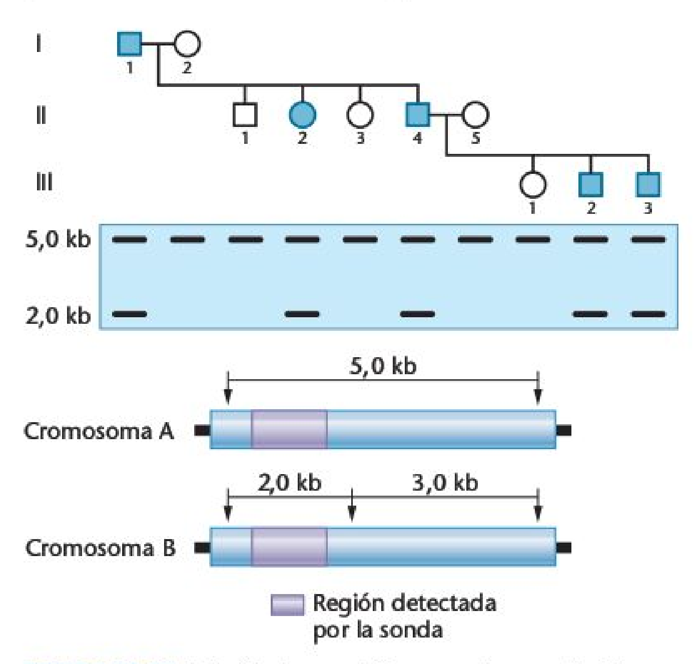


FIGURA 22.23 Este árbol genealógico muestra una familia con miembros afectados por un carácter dominante (símbolos rellenos). Los componentes de esta familia también tienen dos alelos para un locus RFLP asignado al cromosoma 17. El alelo de 5,0 kb (alelo *A*) se encuentra en un homólogo; el alelo *B* del otro homólogo presenta dos fragmentos (2,0 kb y 3,0 kb). La sonda usada en la transferencia de Southern detecta el alelo *A* de 5 kb y la porción de 2 kb del alelo *B*. Debajo del símbolo adecuado del árbol genealógico se muestra el patrón de RFLP del miembro correspondiente de esta familia. En la generación II, tanto II-2 como II-4 están afectados, y recibieron el alelo *B* de su padre, también afectado. La persona III-1, que no está afectada, recibió un alelo *A* de su de cada progenitor. La persona III-2 está afectada y recibió el alelo *A* de su madre y el alelo *B* de su padre, como el hijo menor (III-3), que también está afectado. No todos los miembros de la población están afectados de esta enfermedad, y algunas copias del cromosoma que lleva el alelo B no tendrán el alelo mutante responsable de esta enfermedad. El análisis del árbol genealógico y de la transferencia de Southern sugiere que en esta familia el alelo mutante para el carácter dominante y el alelo *B* de RFLP están en el mismo cromosoma, y que por lo tanto están ligados al cromosoma 17. La asignación de un alelo mutante a un cromosoma por análisis de RFLP es el primer paso en la cartografía de un gen.

cuentran cerca en un mismo cromosoma, mostrarán ligamiento y se heredaran conjuntamente. Sin embargo, la mayoría de los RFLP no mostrarán ligamiento con el fenotipo de la enfermedad porque se encuentran en cromosomas diferentes o hay una recombinación frecuente entre el loci del RFLP y de la enfermedad. Estos datos, sin embargo, no son inútiles; ayudan a identificar los cromosomas y las regiones cromosómicas que *no* contienen el locus de la enfermedad

Se han cartografiado muchos genes en humanos usando el análisis de RFLP, y compilando estudios de muchas familias se ha determinado la localización de muchos marcadores y se han construido mapas genéticos de todos los cromosomas humanos (Figura 22.24). La unidad de ligamiento es el **centimorgan (cM)**, llamado así en recuerdo del genético T. H. Morgan. Un centimorgan es igual a una frecuencia de recombinación del 1 por ciento entre dos loci.

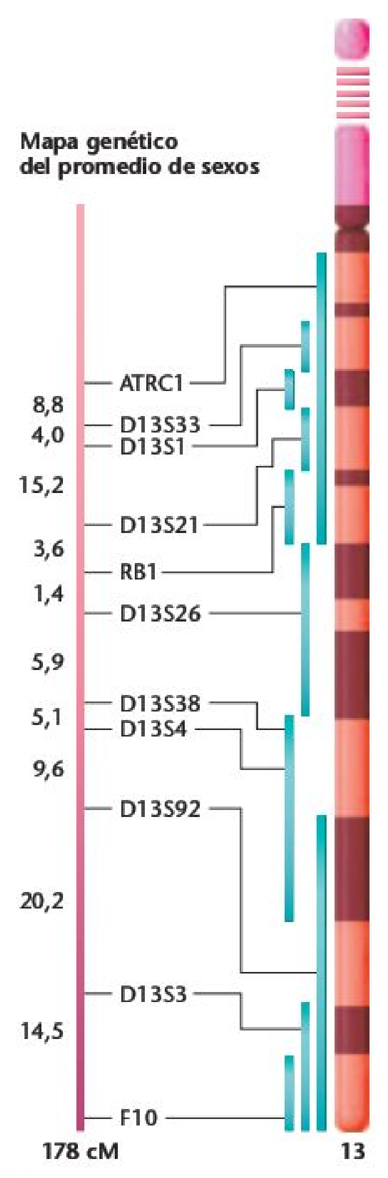


FIGURA 22.24 Mapa genético (barra vertical de la izquierda) y mapa físico (derecha) del cromosoma 13 humano. El mapa genético muestra el orden y la distancia de los marcadores (en centimorgans [cM]). A la derecha se muestra el mapa físico con la localización de los marcadores cromosómicos. Las barras verticales cercanas al cromosoma representan la región donde se localiza en marcador. El mapa genético de las mujeres es de 203 cM, y de los varones es de 158 cM, lo que refleja la diferencia en la frecuencia de recombinación entre mujeres y varones. Cuando se promedian los dos mapas, el resultado es el mapa de promedio de sexos de 178 cM mostrado a la izquierda.

Clonación por posición: el gen de la neurofibromatosis

La utilización de RFLPs para cartografiar genes es una innovación de métodos anteriores de cartografía, que trabajaban del producto génico identificado al locus del gen. La búsqueda del locus cromosómico del gen que causa la neurofibromatosis de tipo 1 (NF1) fue uno de los primeros que usó el análisis de RFLP en cartografía génica. La NF1 es una condición autosómica dominante que afecta a 1 de cada 3000 individuos, y está asociada a defectos del sistema nervioso, incluyendo tumores benignos y un aumento de la incidencia de enfermedades de aprendizaje.

El gen NF1 se cartografió en 1987 mediante análisis de RFLP en varios pasos. Primero, diversos laboratorios de investigación compararon la herencia de NF1 con la de docenas de marcadores RFLP en familias con NF1. Cada marcador RFLP se había asignado a un cromosoma humano específico o a una región cromosómica. Esta primera ronda de análisis no identificó el cromosoma que llevaba el gen *NF1*, pero produjo un **mapa de exclusión** que indicaba en qué cromosomas o en qué regiones cromosómicas *no* estaba localizado el locus *NF1*. Esta investigación también proporcionó pruebas de que podría haber ligamiento entre el gen *NF1* y los cromosomas 5, 10 y 17. El segundo paso usó RFLPs de estos cromosomas para estudiar la herencia de *NF1* en las familias, lo que produjo pruebas concluyentes de que la enfermedad está estrechamente ligada a un RFLP cercano al centrómero del cromosoma 17 (Figura 22.25). En un tercer paso se utilizaron más de 30 marcadores RFLP de esta región del cromosoma 17 para analizar 13.000 individuos de familias NF1, y el gen se cartografió en la región 17q11.2. Finalmente se confirmó la identidad del gen cuando se encontraron versiones mutantes de éste en personas con NF1.

Una vez identificado el gen, se reconstruyó la secuencia aminoacídica del producto génico a partir de la secuencia de DNA. Para identificar proteínas similares en otros organismos se rastrearon bases de datos con información de secuencias proteicas. Los investigadores determinaron que producto génico NF1 es similar a proteínas de transducción de señales. Análisis de la proteína NF1, la **neurofibromina**, confirmaron que está implicada en la transducción de señales intracelulares y en la regulación negativa de un gen que controla el crecimiento celular. La mutación en el gen *NF1* conduce a la pérdida del control del crecimiento celular, lo que provoca la producción de los pequeños tumores característicos de esta enfermedad.

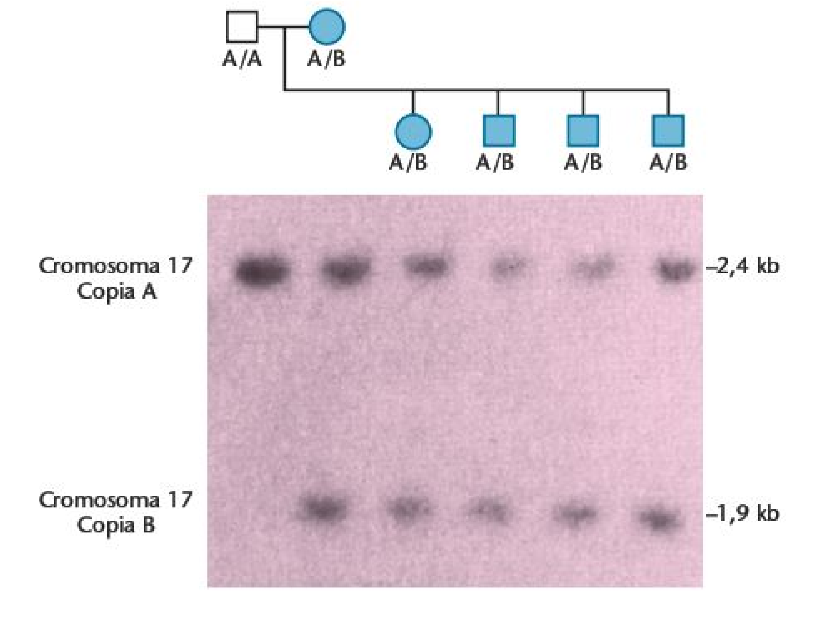


FIGURA 22.25 Segregación de un alelo de RFLP de 1,9 kb con la neurofibromatosis de tipo I (NFI) en cuatro descendientes afectados y en su madre. Este RFLP se detecta con la sonda pA10-41, que es un segmento de DNA cercano al centrómero del cromosoma 17 humano. Basándose es este y en otros resultados utilizando otras sondas, el locus para NFI se asignó al cromosoma 17. *De Baker, D., et al. 1987. «Gene for von Recklinghausen Neurofibromatosis is in the Pericentromic Region of Chromosome 17». Science 236:1100-1102, Fig. 1 © 1987 por la American Association for the Advancement of Science*

Los investigadores empezaron el proyecto de cartografía del gen NF1 sin tener ninguna prueba directa de la naturaleza de su producto génico ni de los sucesos mutacionales que producen el fenotipo NF1. La cartografía, clonación, y secuenciación de este gen se realizó en poco más de tres años, y es un ejemplo de **clonación por posición**, un método de cartografía génica que no precisa un conocimiento previo del producto génico. Utilizando esta estrategia se están cartografiando, aislando y clonando un número cada vez mayor de genes humanos.

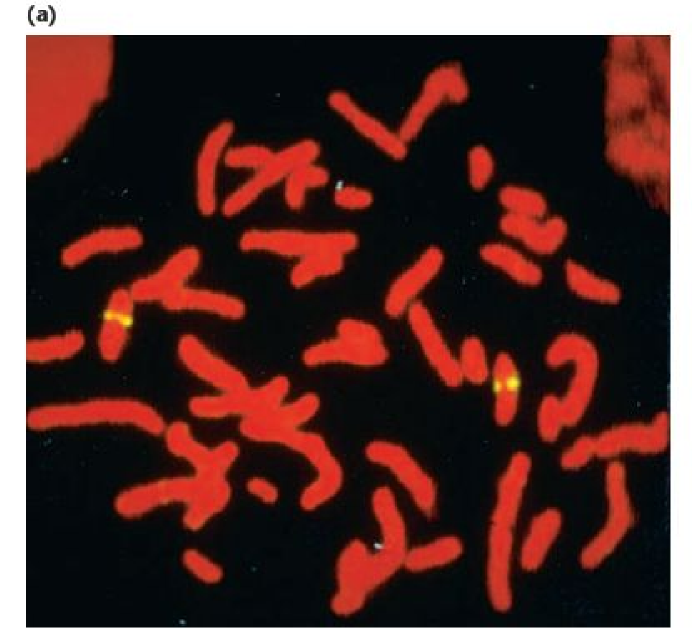
Cartografía génica por hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Además de los métodos como la cartografía por RFLP, los genes se pueden cartografiar directamente sobre cromosomas metafásicos en un proceso denominado hibridación *in situ*. (Véase el capítulo 10 para una discusión sobre la hibridación de DNA.) Se desnaturalizan cromosomas metafásicos extendidos sobre portaobjetos, lo que convierte el DNA cromosómico de doble cadena en moléculas de cadena sencilla. Se hibrida la preparación cromosómica con una sonda marcada que contenga todo el gen o una parte de él. La sonda puede estar marcada con un isótopo radioactivo, con anticuerpos o con colorantes fluorescentes. En comparación con la utilización de geles en la transferencia de Southern, los híbridos resultantes se examinan y se detectan con un microscopio.

Cuando se unas un colorante fluorescente para marcar las sondas, para examinar la preparación cromosómica y determinar el sitio de hibridación se utiliza un microscopio de fluorescencia. Esta técnica, conocida como **hibridación *in situ* fluorescente** (**FISH**, del inglés *fluorescent in situ hybridization*) se puede usar para signar directamente un gen clonado a un locus cromosómico (Figura 22.26a). Esta técnica tiene una resolución de aproximadamente 1 Mb, y actualmente se usa de manera rutinaria para cartografiar genes humanos.

Si se usa FISH sobre fibras, un variación de la técnica de FISH, se puede obtener una resolución 10 veces superior (alrededor de 100 kb). En el FISH sobre fibras, las fibras cro-

(a)



(b)



FIGURA 22.26 (a) Cartografía de un gen por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre cromosomas metafásicos. Los sitios de hibridación aparecen como puntos amarillos en las cromátidas hermanas en el par de cromosomas. (b) Localización de cuatro grupos de dos secuencias de DNA diferentes (DAZG5 y DAZG2) en una fibra cromosómica.

mosómicas se estiran a lo largo de un portaobjetos de vidrio durante la preparación de los cromosomas. (Véase el capítulo 12 para una discusión sobre la organización de los cromosomas.) Las sondas fluorescentes se hibridan a las fibras (Figura 22.26b). Este método se usa para establecer directamente el orden y la distancia entre dos o más genes en un cromosoma.

22.8 Las huellas moleculares del DNA pueden identificar personas

Como se discutió en la sección anterior, la presencia o la ausencia de sitios de restricción en el genoma humano se puede usar como marcador genético. Otro marcador genético, descubierto a mediados de la década de 1980, se basa en la variación de la longitud de los grupos de secuencias repetitivas de DNA. Estos polimorfismos del DNA humano sirven de base para la huella molecular del DNA. La huella molecular del DNA se usa para una amplia gama de aplicaciones, desde identificar la paternidad hasta la medicina forense y la biología de la conservación.

Minisatélites (VNTR) y microsatélites (STR)

Los **minisatélites** son grupos repetidos de 10 a 100 nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia

5′-GACTGCCTGCTAAGATGACTGCCTGCTAAGAT
GACTGCCTGCTAAGATGACTGCCTGCTAAGA
TGACTGCCTGCTAAGATGACTGCCTGCTAAGAT
GACTGCCTGCTAAGATGACTGCCTGCTAAGA
TGACTGCCTGCTAAGAT-3′

está formada por nueve repeticiones en tándem de la secuencia de 16 pares de bases GACTGCCTGCTAAGAT. Hay grupos de estas secuencias ampliamente distribuidos por todo el genoma humano. El número de repeticiones en cada locus varía desde 2 hasta más de 100. Estos loci, que se conocen como **repeticiones en tándem de número variable (VNTR)**, se introdujeron en el Capítulo 12 como ejemplos de DNA moderadamente repetitivo. El número de repeticiones en un locus dado es variable, y cada variación representa un alelo VNTR. Muchos loci tienen docenas de dichos alelos; en consecuencia, la heterocigosidad es común.

Cuando se corta un DNA con enzimas de restricción y se visualiza mediante transferencia de Southern usando secuencias VNTR como sonda se produce un patrón de bandas. Este patrón se denominó huella molecular del DNA (Figura 22.27) porque es siempre el mismo para un individuo dado, sin que importe el tejido usado como fuente del DNA; además varía entre una persona y otra como si fuesen huellas dactilares reales. De hecho hay tanta variación individual en el patrón de bandas que, en te-

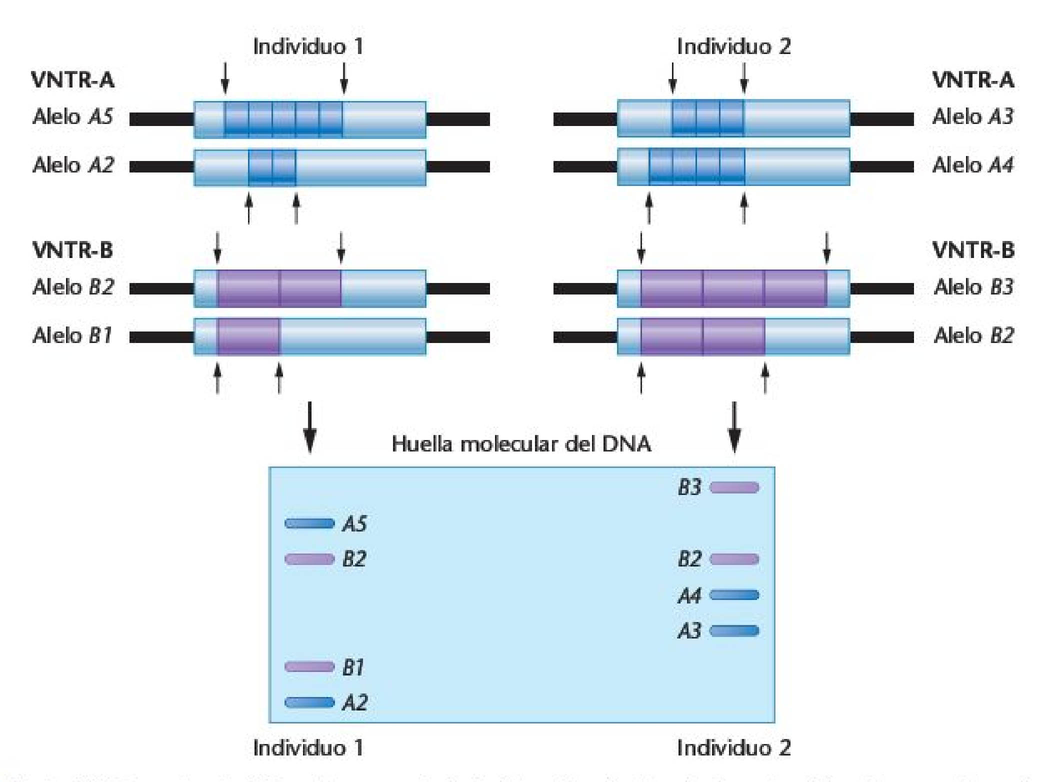


FIGURA 22.27 Alelos VNTR en dos loci (*A* y *B*) para cada individuo. (Las flechas indican los sitios de corte de enzimas de restricción que flanquean los VNTR.) La digestión con las enzimas de restricción produce una serie de fragmentos que pueden detectarse como bandas en una transferencia de Southern (debajo). El número de repeticiones en cada locus es variable, por lo que el patrón general de bandas es diferente para cada individuo, incluso aunque una banda esté compartida (la banda del alelo *B2*). Este patrón es la huella molecular del DNA.

oría, si se analizan suficientes VNTRs, el patrón de cada persona es único. Esta técnica la desarrolló Alec Jeffries durante la década de 1980 y se usó por primera vez para resolver el asesinado de dos escolares en un caso de gran impacto en la Gran Bretaña.

Una limitación importante del análisis de huellas moleculares de DNA con VNTRs es que precisa una muestra relativamente grande de DNA (10.000 células o aproximadamente 50 μg), más de lo que normalmente se encuentra en el escenario de un crimen, y el DNA debe estar relativamente intacto (no degradado). En consecuencia, la huella molecular de DNA es más útil en pruebas de paternidad que en casos criminales. En las pruebas de paternidad, la sangre extraída del niño, la madre y el supuesto padre proporciona una fuente ilimitada de células frescas e intactas para la extracción y el análisis del DNA.

Para superar el problema del tamaño de la muestra de DNA y de las condiciones necesarias para el análisis con VNTRs, como sonda se usan un conjunto de secuencias diferentes pero relacionadas, que se analizan mediante PCR en vez de por análisis de RFLP. Estas secuencias, denominadas **repeticiones cortas en tándem** (del inglés *short tandem repeats*), son muy parecidas a las VNTR, pero el motivo repetido es más corto, entre 2 y 9 pares de bases. Se ha desarrollado un panel marcador (denominado Sistema de Indexado de DNA Combinado, o CODIS) con trece SRTs tetraméricos (repeticiones de cuatro pares de bases) que es usado por el FBI y por otras agencias policiales para realizar el tipaje del DNA de los sospechosos de crímenes (Figura 22.28) y para generar una base de datos que contiene los perfiles de DNA de los criminales convictos.

El análisis de STRs por PCR se usa de manera rutinaria en casos forenses para generar perfiles de DNA a partir de trazas de muestras (p.e. un solo cabello o la saliva dejada en una colilla o en un cepillo de dientes) y a partir de muestras antiguas o degradadas (p.e. un cráneo encontrado en un campo o momias egipcias antiguas). En consecuencia, los SRT han reemplazado a los VNTR en la mayoría de los laboratorios forenses. Además, el tipaje de STRs es menos caro, menos costoso y mucho más rápido que el análisis por RFLP, por lo que también está reemplazando rápidamente el tipaje de VNTR en muchos laboratorios de análisis de paternidad.

Los resultados de los análisis de STR se analizan y se interpretan usando estadística, probabilidad y genética de poblaciones. Se ha medido la frecuencia en la población de cada alelo STR en muchos grupos de personas en los EEUU y en todo el mundo. Usando esta información se puede calcular la probabilidad de tener una combinación de estos 13 alelos. Por ejemplo, si un alelo determinado del locus 1 se encuentra en 1 persona de cada 333, y un alelo concreto del locus 2 se encuentra en 1 de cada 83 personas, la probabilidad de que una persona contenga ambos alelos es igual al producto de sus frecuencias individuales, casi 1 en 28.000 (1/333 × 1/83). Puede que esta probabilidad global no sea muy convincente, pero si a este cálculo se le añade un tercer locus, contenido en 1 de cada 100 personas, y un alelo de un cuarto locus, contenido en 1 de cada 25 personas, la frecuencia combinada se convierte en casi de 1 en 70 millones. Es decir, sólo aproximadamente 4 personas en toda la población de los EEUU tendrá esta combinación de alelos. Cuando se genera el genotipo de los alelos de todos los 13 loci SRT del CODIS (26 alelos en total) para producir un perfil STR completo, la probabilidad de que alguien tenga la misma combinación es de 1 en 100 billones. Puesto que la población del planeta es aproximadamente de sólo 6 mil millones, es fácil ver porqué a menudo el análisis de SRT se denomina la prueba de identificación del DNA humano.

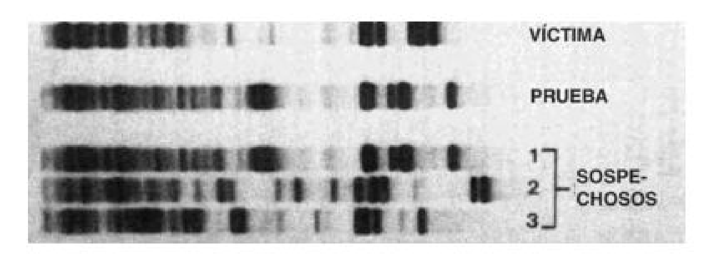


FIGURA 22.28 Los perfiles de DNA preparados usando STRs revelan los patrones de la víctima, de la prueba y de tres sospechosos en un caso criminal.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que se puede identificar con seguridad una persona mediante el perfil de DNA, exceptuando un gemelo idéntico?

Aplicaciones forenses

En un caso criminal, si el perfil de DNA de un sospechoso no concuerda con la prueba se puede excluir a este sospechoso de ser el criminal (las exclusiones ocurren en el 30 por ciento de los casos). Cuando el DNA obtenido en el escenario del crimen y el DNA de un sospechoso *concuerdan*, se pueden hacer dos interpretaciones: (1) la huella molecular del DNA proviene del sospechoso, o (2) es de otra persona con el mismo patrón de bandas. Así, la prueba de la huella molecular de DNA no prueba por si misma la culpabilidad del sospechoso; es solo una prueba más a ser considerada junto con los otros hechos del caso.

Las pruebas de DNA se usaron por primera vez en un caso criminal en Inglaterra en 1986. En los EEUU se usaron por primera vez en un caso de violación acaecido en Florida en 1987. Desde entonces, miles de casos criminales han utilizado perfiles de DNA. En 1998, el FBI inició una base de datos nacional con la catalogación de los perfiles de DNA de los criminales convictos y muestras de DNA recuperadas de los escenarios de los crímenes. Actualmente esta base de datos contiene más de 1,7 millones de perfiles genéticos que se usan para comparar pruebas con posibles sospechosos.

Algunos de los estados de los EEUU también han establecido bancos de datos de perfiles de DNA. Uno de los mayores es el de Virginia, que contiene más de 200.000 muestras. Al ir

creciendo la base de datos, se ha convertido en una herramienta importante para resolver casos criminales en los que no ha habido ningún arresto ni sospechoso. Al confrontar DNA de los escenarios de crímenes con los perfiles de DNA de las bases de datos, entre los años 2000 y 2003 se han resuelto más de 1600 crímenes usando sólo pruebas de DNA.

Genética, tecnología y sociedad

Terapia génica: ¿dos pasos adelante y dos pasos atrás?

En setiembre de 1999, Jesse Gelsinger, un chico de 18 años, recibió su primera dosis de terapia génica. Un gran número de vectores adenovíricos que transportaban el gen de la ornitina transcarbamilasa (*OTC*) se inyectaron en su arteria hepática. Se esperaba que los vectores víricos se alojasen en su hígado, entrasen el las células hepáticas e iniciasen la producción de la proteína OCT. A su vez, la proteína OCT podría corregir su defecto genético y quizás curarle su enfermedad hepática. Sin embargo, en pocas horas se produjo una repentina reacción inmunitaria masiva en todo su cuerpo. Desarrolló una fiebre muy alta, sus pulmones se llenaron de líquido, muchos órganos se desconectaron y murió de un fallo respiratorio agudo cuatro días después. Como consecuencia de esta tragedia se iniciaron diversas investigaciones gubernamentales y científicas. Los investigadores vieron que los científicos de la prueba clínica no comunicaron otras reacciones adversas de la terapia génica, y que algunos de los científicos estaban afiliados a empresas privadas que podían beneficiarse económicamente de estos ensayos. Se encontró que durante la discusión para obtener el consentimiento informado no se había explicado a los pacientes importantes efectos colaterales ocurridos en animales de laboratorio, y que algunos ensayos clínicos se habían realizado demasiado deprisa en vista de los datos que sugerían precaución. La Secretaría de Alimentación y Medicamentos de los EEUU (*Food and Drug Administration,* FDA) examinó ensayos de terapia génica en todo el país, detuvo diversos ensayos y abortó diversos programas de terapia génica. Otros grupos de investigación detuvieron voluntariamente sus estudios de terapia génica.

La muerte de Jesse asestó un duro golpe al competitivo campo de la terapia génica, un golpe del que todavía se estaba recuperando cuando se produjo una segunda tragedia.

En abril del 2000, un grupo francés anunció el éxito de un tratamiento de terapia génica para la inmunodeficiencia combinada grave ligada a X (X-SCID). Fue el primer éxito inequívoco en el campo de la terapia génica. En este estudio, se obtuvieron células de médula ósea de jóvenes pacientes, se trataron con un retrovirus que llevaba el gen de la proteína transmembrana γc, y se transplantaron de nuevo al paciente. Nueve de los 11 pacientes se curaron de su inmunodeficiencia y se les permitió llevar una vida normal. La publicación de este estudio fue recibida con entusiasmo por la comunidad implicada en terapia génica. Pero la euforia volvió a desaparecer en 2003, cuando se hizo evidente que dos de los nueve niños que se habían curado del X-SCID habían desarrollado leucemia como consecuencia directa de esta terapia. Inmediatamente, la FDA detuvo 27 ensayos clínicos parecidos de terapia génica y, de nuevo, la terapia génica experimentó una recesión profunda.

Hasta el aparente éxito de los ensayos franceses en X-SCID, la terapia génica ha sufrido no sólo los escándalos y las investigaciones surgidas tras la muerte de Jesse Gelsinger, si no también del escepticismo de los científicos y del público en general sobre la viabilidad de esta técnica terapéutica tan promocionada.

Desde el primer ensayo clínico de terapia génica de 1990, se han iniciado casi 500 ensayos clínicos que han implicado más de 4.000 pacientes. Estros ensayos pretendían curar cánceres, enfermedades hereditarias como la hemofilia y la fibrosis quística, y enfermedades infecciosas como el SIDA. A pesar de las altas expectativas y de la intensa publicidad, los beneficios terapéuticos han sido poco claros en el mejor de los casos, y lo más frecuente es que no lo haya habido.

El resultado positivo más importante de terapia génica es el del primer ensayo clínico, de 1990. Ashanti Da Silva, que recibió células T transducidas con retrovirus para la inmunodeficiencia combinada grave (SCID), lleva actualmente una vida normal, pero los motivos de este éxito todavía no se han resuelto completamente. Se le ha suministrado un nuevo tratamiento con medicamentos que reemplazan su enzima ADA ausente, tanto antes como después de la terapia génica. Por eso, todavía no se sabe qué parte de su curación es debida a la terapia génica y qué parte al tratamiento con medicamentos.

A finales del 2004 todavía no se ha aprobado la comercialización de ningún producto de terapia génica. Los críticos de la terapia génica continúan criticando los grupos de investigación por sus prisas, los conflictos de intereses, la descuidada gestión de los ensayos clínicos y por prometer mucho y dar poco. A mediados de la década de 1990, el comité de revisión del Instituto Nacional de Salud de los EEUU concluyó que todavía había problemas importantes en todos los aspectos básicos de la terapia génica, incluyendo aquellos aspectos que llevaron a Jesse Gelsinger a la muerte y a leucemias tras el tratamiento para X-SCID: reacciones inmunitarias adversas y efectos colaterales de la integración del vector retrovírico en el genoma del huésped respectivamente.

Queda la pregunta de si la terapia génica podrá recuperarse de estos contratiempos y cumplir su promesa de curar las enfermedades genéticas. Actualmente, en los EEUU hay unos 200 ensayos clínicos en curso; la mayoría son para curar el cáncer, y se encuentran en la fase I del ensayo (que examina la seguridad y la dosis, pero no la eficacia). Se han diseñado fuertes restricciones en los protocolos de los ensayos clínicos para corregir algunos de los problemas de procedimiento que surgieron tras el caso de Gelsinger. Además, la ciencia básica continúa desarrollando vectores más seguros y efectivos, como los que insertan las secuencias del vector en regiones específicas del genoma (lo que reduce la posibilidad de cáncer o de silenciamiento

del vector), y los que llevan receptores en su superficie que les permiten infectar tipos celulares específicos. Sin embargo, son muchos los pasos que conducen a una terapia génica exitosa. Es necesario optimizar la expresión específica de tejido de los genes terapéuticos, transducir eficientemente células sanguíneas en cultivo, predecir y controlar las reacciones inmunitarias de los vectores y desarrollar mejores animales modelo en los que probar las terapias génicas antes de los ensayos clínicos.

Muchos científicos piensan que se debería continuar con la investigación en terapia génica y con los ensayos clínicos a pesar de los contratiempos. Sin embargo, la impresión de su progreso es más sobria. Los ensayos clínicos de cualquier nueva terapia son potencialmente peligrosos, y a menudo los estudios con animales no reflejan con exactitud las reacciones de personas concretas a un nuevo medicamento o procedimiento. Inevitablemente, a medida que los vectores sean más eficientes, en los ensayos clínicos surgirán más reacciones adversas a la terapia génica. Actualmente los investigadores de este campo piensan que todavía queda mucho camino por recorrer, y que será mucho más difícil de lo que se imaginó al principio, pero que no es imposible. Quizás debemos ver la terapia génica como se percibe a los antibióticos, a los transplantes de órganos y a los vuelos espaciales tripulados. Habrá contratiempos e incluso tragedias, pero debemos avanzar hacia una tecnología que podría, algún día, proporcionar curas para muchas enfermedades genéticas graves.

Referencias

Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Gen.* 4:346-58.

Páginas Web

Thompson, L. Sept./Oct. 2000. *Human gene therapy: Harsh lessons, high hopes [on-line]. FDA Consumer Magazine.*

http://www.fda.gov/fdac/features/2000/500_gene.html

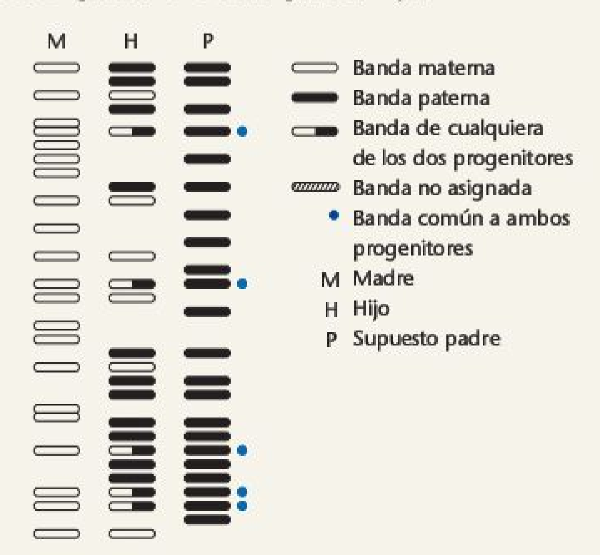
RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. La industria biotecnológica usa los métodos de DNA recombinante para mejorar las plantas cultivadas transfiriéndoles resistencia a herbicidas y a insectos, y para incrementar su valor nutritivo. La biotecnología también se usa para producir productos génicos humanos en diversos huéspedes, que abarcan desde bacterias hasta animales de granja. En un futuro cercano, podría ser posible usar plantas comestibles para vacunar las personas contra enfermedades infecciosas.
2. La tecnología del DNA recombinante ofrece un nuevo enfoque al análisis genético. En vez de basarse en el aislamiento y en el cartografiado de genes mutantes, se manipulan grandes segmentos clonados del genoma para establecer mapas genéticos y físicos utilizando marcadores moleculares en lugar de fenotipos visibles a nivel del organismo.
3. Las técnicas de DNA recombinante se están utilizando para el diagnóstico prenatal de enfermedades génicas humanas, lo que permite el examen directo del genotipo, mientras que los métodos utilizados anteriormente se basaban en la expresión génica y en la identificación del producto génico. Estos métodos también pueden utilizarse para identificar portadores de enfermedades genéticas, la base de las propuestas de rastrear la población para determinadas enfermedades genéticas, incluyendo la anemia falciforme y la fibrosis quística.
4. La disponibilidad de genes clonados humanos ha conducido a su utilización en terapia génica. En la terapia génica somática una copia normal clonada del gen normal se transfiere a un vector; entonces el vector transfiere el gen a un tejido diana que lo incorpora y lo expresa, alterando el fenotipo mutante. El desarrollo de nuevos sistemas de vectores más efectivos significa que, probablemente, la terapia génica será un método normal para tratar enfermedades genéticas.
5. La terapia génica y el Proyecto Genoma Humano han suscitado muchos temas éticos que todavía no se han resuelto. El desarrollo y la aplicación de la biotecnología en medicina han ido más rápido que el consenso sobre cómo utilizar e interpretar esta tecnología. Para tomar decisiones informadas se hace necesaria la investigación y la educación.
6. El DNA clonado está encontrando una amplia gama de aplicaciones, incluyendo el cartografiado de genes y la identificación y el aislamiento de genes responsables de enfermedades hereditarias. La clonación por posición, que se basa en la tecnología del DNA recombinante, permite el cartografiado y la identificación de un gen sin ningún conocimiento previo de su naturaleza o de la función de su producto génico.
7. Las técnicas de DNA recombinante que detectan variantes alélicas de repeticiones nucleotídicas variables en tándem (huella molecular del DNA) han encontrado aplicaciones en medicina forense, en pruebas de paternidad y en una amplia gama de otros campos, incluyendo la arqueología, la biología de la conservación y la salud pública.

IDEAS Y SOLUCIONES

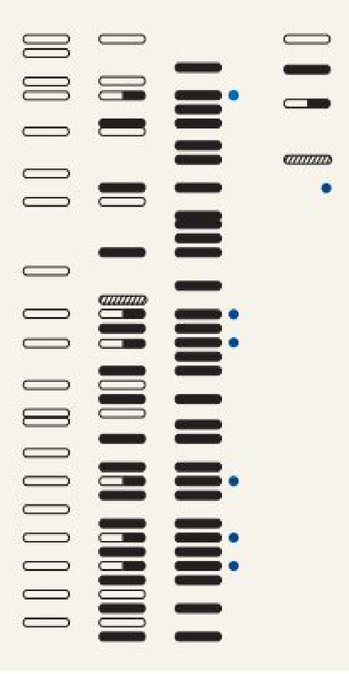
1. Las sondas para la huella molecular del DNA pueden proceder de un solo locus o de múltiples loci. Dos sondas de loci múltiples que proceden del loci minisatélite del cromosoma 11 (1cen-q24) y del cromosoma 7 (7q31.3) se han utilizado ampliamente tanto en casos criminales como civiles. Estas sondas, que se usan porque producen una huella molecular altamente individualizada, han determinado la paternidad en miles de casos durante la pasada década. En la siguiente figura se muestran los resultados de la huella mo-

lecular del DNA de la madre (M), del padre putativo (P) y del hijo (H), usando las sondas mencionadas. El hijo tiene 6 bandas maternas, 11 bandas paternas y 5 bandas compartidas entre la madre y el supuesto padre. Basándose en estas huellas moleculares, ¿podría concluir que este hombre es el padre del hijo?



Solución: Todas las bandas presentes en el hijo pueden asignarse como provenientes de la madre o del padre. Dicho de otra manera, todas las bandas de la huella molecular del DNA del hijo que no son maternas están presentes en el padre. Puesto que el padre y el hijo comparten 11 bandas, y el hijo no tiene bandas sin asignar, la paternidad del padre puede establecerse con seguridad. De hecho, la probabilidad de que el varón analizado no sea el padre es del orden de 10^{-13}.

2. A continuación se muestra la figura de las huellas moleculares de una madre, un hijo y el supuesto padre. En este segundo caso, el hijo tiene 8 bandas maternas, 15 bandas paternas, 6 bandas comunes a la madre y al supuesto padre y 1 banda que no está presente ni en la madre ni en el supuesto padre. ¿Cómo puede explicarse la presencia de esta banda? Basándose en el análisis del patrón de bandas, ¿qué explicación es la más probable?



Solución: En este caso, una banda del hijo no puede asignarse a ninguno de los progenitores. Las dos posibles explicaciones son que el hijo es mutante para una banda o que el varón analizado no es el padre. Para estimar las probabilidades de la paternidad se determina el número medio (n) de bandas resueltas, y se calcula la probabilidad media (x) de que una banda de un individuo A concuerde con un segundo individuo B no relacionado. En este caso, puesto que el hijo y el padre comparten 15 bandas, la probabilidad de que el varón analizado no sea el padre es muy baja (una probabilidad de 10^{-7} o menor). En consecuencia, la explicación más probable es que el hijo sea mutante para una sola banda. De hecho, en 1419 casos resueltos de paternidad auténtica con las sondas de los minisatélites de los cromosomas 1 y 7, se registraron 399 casos en que los hijos tenían una banda única, lo que significa el 28 por ciento de todos los casos.

3. La infección por HIV-1 (el virus de inmunodeficiencia adquirida humana) es responsable de la destrucción de células del sistema inmunitario y provoca los síntomas del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). El HIV infecta y mata células del sistema inmunitario que tienen un receptor de superficie celular conocido como CD4. Una proteína de superficie del HIV conocida como gp120 se une al receptor CD4 y permite que el virus entre en la célula. Se ha clonado el gen que codifica la proteína CD4. ¿Cómo puede utilizarse este clon, junto con técnicas de DNA recombinante, para combatir la infección de HIV?

Solución: Se han explorado varios métodos que utilizan el gen CD4 para combatir la infección de HIV. Primero, puesto que la infección depende de la interacción entre la proteína gp120 vírica y la proteína CD4, se ha modificado el gen CD4 clonado para que produzca una forma soluble de la proteína (sCD4). La idea es que puede prevenirse la infección de las células por el HIV si la proteína gp120 del virus se une con la forma soluble de la proteína CD4. De esta manera no se puede unir a proteínas CD4 de la superficie de las células del sistema inmunitario. Investigaciones en células en cultivo indican que la presencia de sCD4 evita de manera efectiva la infección de las células en cultivo por el HIV. Sin embargo, las investigaciones en pacientes positivos a HIV han sido decepcionantes, principalmente debido a que las cepas de HIV utilizadas en el laboratorio son diferentes a las encontradas en las personas infectadas. Puesto que las células infectadas por el HIV tienen la proteína vírica gp120 en su superficie, para matarlas el gen CD4 se ha fusionado con genes que codifican toxinas bacterianas. La proteína de fusión resultante contiene la región de CD4 que se une a gp120 y a las regiones de la toxina que matan a la célula infectada. En experimentos con células en cultivo, la proteína de fusión mata a las células infectadas con el HIV, mientras que las células no infectadas sobreviven. Los investigadores esperan que la domiciliación de medicamentos y toxinas pueda utilizarse en aplicaciones terapéuticas para tratar la infección del HIV.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. En un intento de vacunación contra enfermedades mediante la ingestión de antígenos (como la toxina del cólera), el antígeno debe legar hasta las células del intestino delgado. ¿Cuáles son algunos de los problemas potenciales de este método? ¿Por qué las moléculas de comida no absorbidas estimulan el sistema inmunitario provocando alergia a la comida ingerida?
2. Uno de los principales temas de seguridad asociados con las plantas de cultivo genéticamente modificadas es la capacidad alérgica potencial causada por la introducción de un alergeno, o causada por el cambio del nivel de expresión de un alergeno del huésped. Puesto que a menudo las proteínas alérgicas comunes tienen un techo idéntico de unos pocos aminoácidos (6 ó 7) en común, Kleter y Peijnenburg (2002, *BMC Struct. Bio*. 2:8) desarrollaron un método para rastrear plantas de cultivo transgénicas para evaluar propiedades alérgicas potenciales. ¿Cómo cree que lo lograron?
3. A finales del 2004, en los EEUU había más de 1000 animales de granja clonados. Durante los dos siguientes años, leche de vacas clonadas y de sus descendientes (engendrados de manera natural) puede estar disponible en los supermercados. Estos animales son clones, pero no han sido modificados transgénicamente, y no son diferentes a dos mellizos idénticos. ¿Debería etiquetarse la leche de estos animales y de sus descendientes engendrados de manera natural indicando que proceden de vacas clonadas o de sus descendientes? ¿Por qué?
4. Una de las causas principales de enfermedad, muerte y pérdidas económicas en la industria de los bóvidos en la *Mannheimia haemolytica*, que causa la pasteurelosis bovina (la fiebre de los barcos). El suministro no invasivo de vacuna usando plantas transgénicas que expresan inmunógenos reduciría los costes del trabajo y el trauma a la cabaña. Un paso inicial para el desarrollo de una vacuna comestible es determinar si una versión inyectable del antígeno (normalmente un derivado del patógeno) es capaz de estimular el desarrollo de anticuerpos en un organismo de prueba. La tabla que se muestra a continuación evalúa la capacidad de una porción transgénica de una toxina (Lkt) de *M. haemolytica* clonada en trébol blanco para estimular el desarrollo de anticuerpos específicos en conejo. (Tabla modificada de Lee et al. 2001. *Infect. And Immunity* 69: 5786-93.) (a) ¿Qué conclusiones generales puede extraer de estos datos? (b) Con respecto al desarrollo de una vacuna comestible, ¿qué trabajo queda por hacer?

Inmunógeno inyectado	Producción de anticuerpos en el suero
Lkt50*—extracto salino	+
Lkt50—extracto de columna	+
Inyección placebo	–
Preinyección	–

* Lkt50 es un pequeño derivado de Lkt que carece de todas las regiones hidrofóbicas.
+ indica al menos un 50% de neutralización de la toxicidad de Lkt; – indica que no hay neutralización de la actividad.

5. Resuma los pasos implicados en la transferencia de resistencia a glifosato a una planta de cultivo. ¿Considera que este carácter puede escapar de la planta de cultivo y convertir a las malas hierbas en resistentes al glifosato? ¿Por qué sí o por qué no?
6. Ahora que se ha aprobado la terapia de incremento usando un producto génico, ¿se puede justificar la terapia génica de incremento?
7. Los adenovirus recombinantes se han usado en diversos estudios preclínicos para determinar la eficacia de la terapia génica para la artritis reumatoide y la osteoartritis. Los genes se pueden suministrar por inyección a los tejidos que los necesitan. Christopher Evans y sus colaboradores (2001, *Arthritis Res.* 3:142-46) estimaron que aproximadamente el 20 por ciento de todos los ensayos de terapia génica han usado adenovirus para suministrar el gen. La muerte de un paciente en 1999 tras la infección de vectores adenovíricos ha causado preocupación. Si considera el uso de vectores víricos como vehículos de suministro del agente terapéutico, ¿qué factores parecen ser más preocupantes?
8. Defina terapia génica somática, terapia de la línea germinal y terapia génica de incremento. ¿Cuál de ellas se usa actualmente?
9. La *domiciliación transduccional* es la vía preferida para suministrar productos terapéuticos para enfermedades humanas. Implica el desarrollo de interacciones específicas de tejido entre el vector vírico y el tejido específico. Una aproximación genética usada por Ponnazhagan y sus colaboradores (2002, *J. Virol.* 76:12,900-07) implica el diseño de una cápside de un vector vírico adenoasociado (tipo 2) para domiciliar tipos celulares humanos específicos. También hay aproximaciones no genéticas posibles. Especule sobre los problemas asociados con la aproximación genética de alterar una cápside y los problemas que podrían llevar asociadas las aproximaciones no genéticas para la domiciliación transduccional.
10. El desarrollo de vectores seguros para la terapia génica humana ha sido un objetivo desde 1990. De los diversos problemas asociados con los vectores basados en virus, muchos de estos virus (p.e. SV40) tienen propiedades transformantes que se cree que están mediadas por la unión y la inactivación de productos génicos como p53, la proteína retinoblastoma (pRB) y otras. Mark Cooper y sus colaboradores (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94:6450-55) desarrollaron vectores basados en SV40 que son deficientes para su unión a p53, a pRB y a otras proteínas. ¿Por qué querría evitar específicamente la inactivación de p53, pRB y otras proteínas relacionadas?
11. La terapia génica para enfermedades genéticas humanas implica la transferencia de una copia del gen humano normal en un tejido diana. Presumiblemente, el gen entra en el tejido diana, se activa, y el producto génico mitiga los síntomas. (a) ¿Por qué hay enfermedades, como la distrofia muscular, que son difíciles de tratar con terapia génica? (b) ¿Cuáles son los problemas potenciales de utilizar retrovirus como vectores? (c) ¿La terapia génica debería implicar a los tejidos germinales en vez de a los somáticos? ¿Cuáles son algunos de los problemas éticos potenciales asociados a este enfoque?
12. la secuenciación del genoma humano y el desarrollo de la tecnología de las microordenaciones promete mejorar la compren-

sión del comportamiento celular normal y anormal. En un artículo sobre la aplicación de la tecnología de las microordenaciones en investigación del cáncer de mama (2001. *Breast Can. Res.* 3:158-75), Cooper afirmó que «los datos de estos estudios podrían revolucionar el diagnóstico el cáncer». (a) ¿Qué es la tecnología de las microordenaciones? (b) ¿De qué manera podría esta tecnología revolucionar nuestra comprensión del cáncer?

13. ¿Cuáles son las ventajas de usar STRs en vez de VNTRs para identificar DNA?

14. Al producir mapas físicos de marcadores y de secuencias clonadas, ¿qué ventaja ofrece *Drosophila* que otros organismos, incluyendo la especie humana, no ofrecen?

15. (a) Resuma los pasos implicados en la identificación de un gen por clonación por posición. ¿Qué pasos pueden provocar dificultades en este proceso? (b) Una vez se ha identificado que una región de un cromosoma contiene un gen dado, ¿qué tipo de mutaciones acelerarían el proceso de identificar el locus?

16. ¿Por qué la clonación por posición es una estrategia útil para identificar y cartografiar un gen mutante? ¿Para qué tipo de enfermedad genética es más adecuada la clonación por posición?

17. ¿Qué es un mapa de exclusión, y por qué es útil?

18. El fenotipo de muchos caracteres del comportamiento como la depresión maníaca o la esquizofrenia puede estar controlados por varios genes, localizados en diferentes cromosomas o segmentos cromosómicos. ¿Puede utilizarse la clonación por posición para cartografiar y aislar estos genes? ¿Qué sucede si consideramos un carácter controlado por seis genes, cada uno contribuyendo por igual de manera aditiva al fenotipo? ¿Se puede utilizar la clonación por posición en este caso? ¿Por qué sí o por qué no?

19. Suponga que desarrolla un método de rastreo para la fibrosis quística que le permite identificar la mutación predominante $\Delta 508$ y las otras seis mutaciones más corrientes. ¿Qué necesita considerar antes de utilizar este método para rastrear esta enfermedad en la población general?

20. Una pareja con ancestros europeos pide consejo genético antes de tener hijos, puesto que en la familia del esposo hay casos de fibrosis quística (CF). La prueba ASDO para la CF revela que el esposo es heterocigoto para la mutación $\Delta 508$ y que la esposa en heterocigota para la mutación *R117*. Usted es la pareja del consejero genético. En un encuentro con usted, le expresan su convicción de que no tienen ningún riesgo de tener un hijo afectado porque son portadores de mutaciones diferentes y no pueden tener un hijo que sea homocigoto para ninguna de ellas. ¿Qué les diría?

21. Las mutaciones dominantes pueden catalogarse en función de si aumentan o disminuyen la actividad general de un gen o de un producto génico. Aunque una **mutación de pérdida de función** (es decir, una mutación que inactiva el producto génico) es normalmente recesiva, para algunos genes una dosis del producto génico no es suficiente para producir un fenotipo normal. En este caso, una mutación de pérdida de función del gen será dominante y se dice que el gen es *haploinsuficiente*. Una segunda categoría de mutaciones dominantes son las **mutaciones de adquisición de función**, que resultan en un incremento de la actividad o expresión del gen o del producto génico. El fenotipo de estas mutaciones se produce por tener demasiado producto génico. La técnica de la terapia génica utilizada actualmente en procesos clínicos implica la «adición» de una copia normal de un gen en células somáticas. En otras palabras, una copia normal del gen se inserta en el genoma de una célula somática mutante, pero la copia mutante del gen no se elimina ni se reemplaza. ¿Funcionará esta estrategia en ambos tipos de mutaciones dominantes?

22. ¿Por qué la mayoría de las proteínas recombinantes humanas se producen en huéspedes animales o en plantas en vez de en células huésped bacterianas?

23. A continuación se muestra la secuencia de DNA que flanquea el sitio de la mutación de la anemia falciforme en la β-globina para los genes normal y mutante:

5′– GACTCCTGAGGAGAAGT– 3′
3′– CTGAGGACTCCTCTTCA – 5′
DNA normal

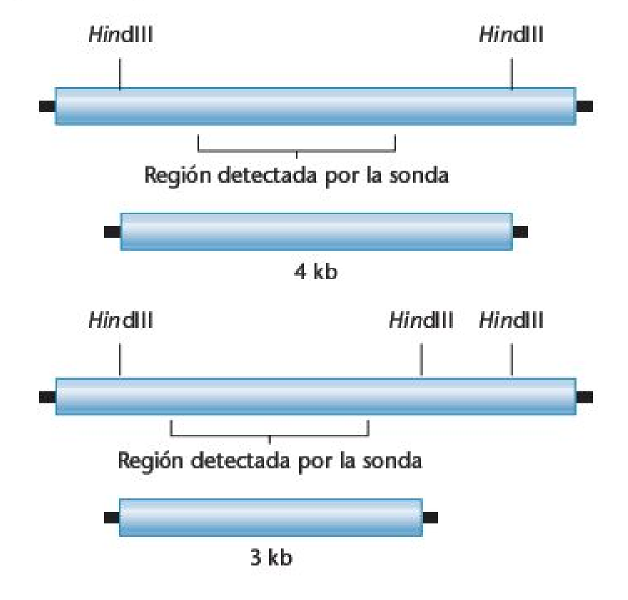
5′– GACTCCTGTGGAGAAGT– 3′
3′– CTGAGGACACCTCTTCA– 5′
DNA de anemia falciforme

Cada tipo de DNA se desnaturaliza en cadenas sencillas y se aplica a un filtro. El papel que contiene las dos aplicaciones (manchas) se hibrida a un ASO (oligonucleótido específico de alelo) con la siguiente secuencia ASO

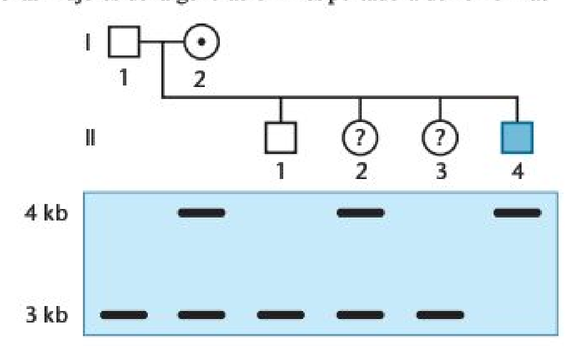
5′-GACTCCTGAGGAGAAGT-3′

¿Qué aplicación hibridará con esta sonda, si es que hibrida alguna?

24. Un tipo de hemofilia, una enfermedad de coagulación de la sangre ligada al cromosoma X, está provocada por una mutación en el factor de coagulación VIII. Se han descrito muchas mutaciones de este gen que afectan a un solo nucleótido, lo que hace que la detección de los genes mutantes por la transferencia de Southern no sea eficiente. Sin embargo, hay un RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) para la enzima *Hin*dIII en un intrón del gen del factor VIII que a menudo puede utilizarse para rastreos, como se muestra a continuación.



Una mujer cuyo hermano padece hemofilia tiene el 50 por ciento de probabilidades de ser portadora de la enfermedad. Para analizar su condición, se obtiene DNA de los glóbulos blancos de los miembros de la familia, se corta con la enzima *Hind*III, y los fragmentos se hibridan y se visualizan por la transferencia de Southern. Con los resultados que se muestran a continuación, determine si alguna de las mujeres de la generación II es portadora de hemofilia.

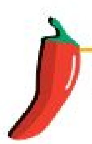


25. El gen de la insulina humana contiene intrones. Puesto que las células bacterianas no eliminarán los intrones del mRNA, ¿cómo puede clonarse un gen como éste en una célula bacteriana y producir insulina?

26. En ratones transfectados con el gen de la β-globina de conejo, el gen de conejo está activo en varios tejidos, incluyendo el bazo, el cerebro y el riñón. Además, algunos ratones padecen talasemia (un tipo de anemia), provocada por un desequilibrio en la producción coordinada de α- y β-globina. ¿Qué problemas asociados a la terapia génica se ilustran con este descubrimiento?

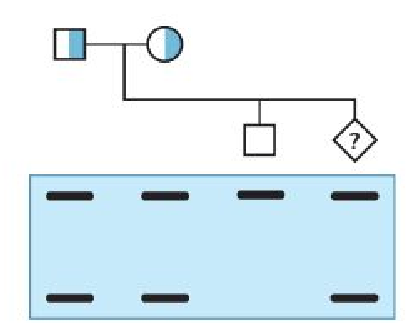
27. Ya se usa rastreo genómico para detectar susceptibilidad a enfermedades. A medida que esta tecnología se vaya usando de manera más amplia, los registros médicos contendrán los resultados de estas pruebas. ¿Quién debería tener acceso a esta información? ¿Se debería permitir a los empresarios, a los empresarios potenciales y a las compañías aseguradoras tener esta información? ¿Estaría de acuerdo o se opondría a que el gobierno estableciese y mantuviese una base de datos central que contuviese los resultados del rastreo genómico de los miembros de la población?

28. ¿Qué limita el uso de diferencias en sitios de enzimas de restricción como una manera de detectar mutaciones puntuales en los genes humanos?

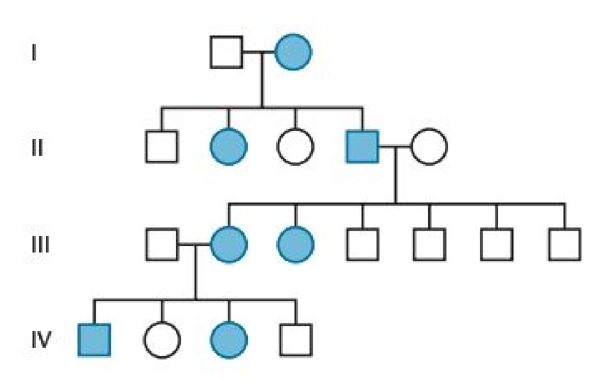


Problemas extra-picantes

29. Se le pide que ayude en una prueba genética prenatal de una pareja que son portadores de una deleción del gen de la β-globina que produce β-talasemia cuando está en homocigosis. La pareja tiene ya un hijo que no está afectado y que no es portador. La mujer está embarazada, y la pareja desea conocer la condición del feto. Para ello recibe muestras de DNA obtenidas del feto por amniocentesis, y del resto de la familia por extracción de glóbulos blancos. Utilizando una sonda que detecta la deleción, obtiene la siguiente transferencia. ¿Está afectado el feto? ¿Cuál es su genotipo para el gen de la β-globina?

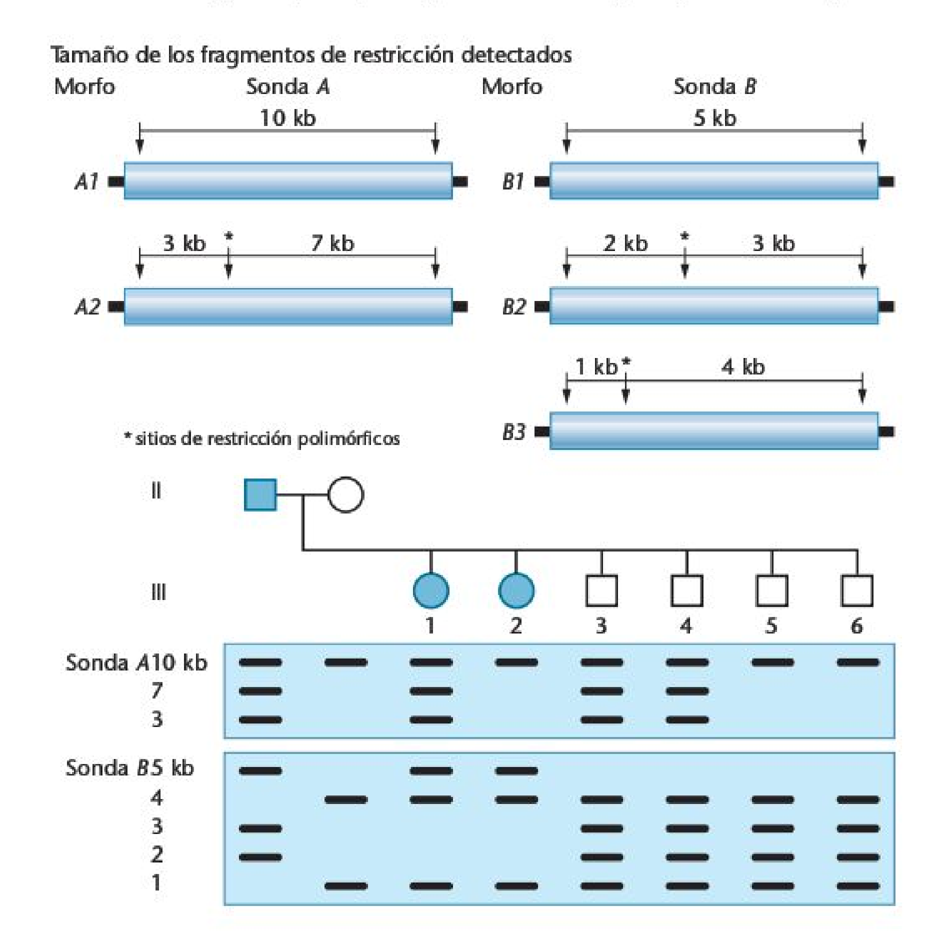


30. A continuación se presenta un árbol genealógico que muestra la herencia de una enfermedad poco corriente. (a) ¿Qué tipo o tipos de herencia quedan excluidos o son congruentes con este árbol genealógico?



Se obtienen muestras de DNA de las generaciones II y III y se someten a análisis de ligamiento de RFLP. Uno de los RFLP examinados está en el cromosoma 10 (y lo identifica la sonda A), y el otro está en el cromosoma 21 (y lo identifica la sonda B). El resultado de este análisis se muestra en la siguiente página. Suponga que los datos adicionales se obtuvieron en esta familia, y que son congruentes con los datos mostrados y estadísticamente significativos. (b) ¿En qué cromosoma se localiza el gen de la enfermedad? (c) La mujer III-1 se casa con un varón normal cuyo genotipo RFLP es *A1A2* y *B1B1*. ¿Qué tipo de prueba de diagnóstico prenatal puede hacerse para determinar si el hijo que esperan será normal? Describa lo que puede concluir en función de los posibles resultados, e indique la fiabilidad de esta prueba. (d) El varón III-4 se casa con una mujer de genotipo *B1B1*. Tienen

un hijo que es *B1B1*. El padre supone que el hijo es ilegítimo, pero la madre, que está cursando un curso de genética, dice que el hijo podría ser el resultado de un suceso ocurrido en la línea germinal del padre y menciona dos posibilidades. ¿Cuáles son?



LECTURAS SELECCIONADAS

Anderson, W.F. 2000. The best of times, the worst of times. *Science* 288:627-28.

Atherton, K.T. 2002. Safety assessment of genetically modified crops. *Toxicol*. 81/182:421-26.

Bleck, O., McGrath, J.A., and South, A.P. 2001. Searching for candidate genes in the new millennium. *Clin. Exp. Dermatol*. 26:279-83.

Cavanna-Calvo, M. et al. 2000. Gene therapy of severe combined immunodeficiency (SCID)-XI disease. *Science* 288:669-72.

Dale, P.J., Clarke, B., and Fontes, E.M. G. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat. Biotechnol*. 20:567-74.

Daniell, H., Streatfield, S.J., and Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: Production of antibodies *Trends in Plant Sci*. 6:219-226.

Engler, O.B. et al. 2001. Peptide vaccines against hepatitis B virus: From animal model to human studies. *Mol. Immunol*. 38:457-65.

Gaugitsch, H. 2002. Experience with environmental issues in GM crop production and the likely future scenarios. *Toxicol. Letters* 127:351-57.

Kmiec, E.B. 1999. Gene therapy. *Amer. Scient*. 87:240-47.

Pray, C.E., Huang, J., and Rozelle, S. 2002. Five years of Bt cotton in China: the benefits continue. *The Plant J*. 31:423-30.

Riley, J.H. et al. 2000. The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes. *Pharmacogen*. 1:39-47.

Schillberg, S., Fischer, T., and Emans, N. 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol. Life Sci*. 60:433-45.

Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet*. 4:346-58.

Walmsley, A.M., and Artzen, C.J. 2003. Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol*. 14:145-50.

Wisniewski, J-P., Frangne, N., Massonneau, A., and Dumas, C. 2002. Between myth and reality: Genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie* 84:1095-1103.

Yang, X., Tian, X.C., and Wang, B. 2000. Transgenic farm animals: applications in agriculture and biomedicine. *Biotechnol. Annu. Rev*. 5:269-92.

Genética del desarrollo de organismos modelo



Esta rara Drosophila, *con cuatro alas, ha desarrollado un par de alas extra como consecuencia de una mutación homeótica.*

Conceptos del capítulo

- La acción génica en el desarrollo se basa en la transcripción diferencial de genes seleccionados y no en la retención y pérdida de genes del genoma.
- Los animales pluricelulares utilizan un pequeño número de sistema de señales y redes reguladoras para construir las formas adultas del organismo a partir del zigoto, haciendo posible la utilización de animales modelo para estudiar el desarrollo en la especie humana.
- La diferenciación está controlada por cascadas de acción génica que siguen con el establecimiento del destino del desarrollo.
- Las plantas evolucionaron mecanismos de desarrollo paralelamente a los de los animales.
- Las señales de célula a célula programan el destino del desarrollo de células adyacentes y distantes.
- La apoptosis, o muerte celular programada, es un aspecto normal del desarrollo.

En plantas y en animales pluricelulares, un óvulo fecundado comienza un ciclo de sucesos de desarrollo que al final origina un miembro adulto de la especie de la que procedían el óvulo y el esperma. Miles, millones e incluso miles de millones de células se organizan en una unidad cohesionada y coordinada que percibimos como un organismo vivo (Figura 23.1). La serie de sucesos a través de los cuales los organismos alcanzan su forma adulta final, la estudian los biólogos del desarrollo. Esta área de investigación es, quizás, la más fascinante de la biología. No solo porque la comprensión de los procesos del desarrollo requiere el conocimiento de muchas disciplinas de la biología —como la biología molecular, celular y de los organismos— sino también por la comprensión de cómo los procesos biológicos cambian con el tiempo y finalmente transforman a los organismos.

En los últimos 100 años, investigaciones en embriología, en genética, en bioquímica, en biología molecular, en fisiología celular, en biofísica y en evolución han contribuido al estudio del desarrollo. En general, los descubrimientos han indicado la tremenda complejidad de los procesos del desarrollo. Desgraciadamente, la descripción de lo *que* sucede no responde al «porqué» ni al «cómo» del desarrollo.

Sin embargo, durante las dos últimas décadas, el análisis genético y la biología molecular han demostrado que a pesar de la enorme diversidad en tamaño y forma del estado adulto, todos los organismos pluricelulares comparten muchos genes, rutas genéticas y mecanismos de señalización molecular en los procesos que van del zigoto al adulto. El desarrollo está marcado por dos importantes hechos: **determinación**, el momento en el que queda fijado el destino de desarrollo específico de una célula y **diferenciación**, el proceso por el que una célula alcanza su forma y función final. Además, la genómica ha demostrado que existen relaciones íntimas entre los organismos superiores. El análisis genético ha identificado genes que regulan los procesos de desarrollo, y ahora estamos empezando a entender cómo la acción y la interacción de estos genes controla los procesos básicos del desarrollo en miembros del reino animal.

En este capítulo, el principal énfasis será en cómo se ha utilizado la genética para estudiar el desarrollo. Esta área, llamada genética del desarrollo, ha contribuido enormemente a nuestra comprensión de los procesos de desarrollo, ya que se requiere información genética para las funciones moleculares y celulares que intervienen en los sucesos de desarrollo y contribuyen al fenotipo final de los organismos nuevos que se forman.

(a)



(b)



FIGURA 23.1 (a) Embrión de *Drosophila* y (b) mosca adulta que se desarrolla del embrión.

23.1 La genética del desarrollo busca explicar cómo se produce un estado diferenciado a partir del genoma de un organismo

Los genéticos del desarrollo utilizan mutaciones para preguntarse cuestiones importantes acerca del desarrollo: ¿Qué genes se expresan? ¿Cuándo se expresan? ¿En qué células se expresan? y ¿a qué nivel tiene lugar la expresión? Estas cuestiones acerca de la expresión de gen son el fundamento para explorar las bases moleculares de los procesos de desarrollo, como la determinación, inducción, comunicación célula a célula y diferenciación celular. El objetivo es utilizar el análisis genético para establecer una relación causal entre la presencia o ausencia de inductores, receptores, sucesos transcripcionales e interacciones entre células y tejidos, y los sucesos morfológicos observables que acompañan al desarrollo.

Una manera útil de definir el **desarrollo** es decir que es la *obtención de un estado diferenciado* por todas las células de un organismo. Por ejemplo, la célula de un embrión en el estadio de blástula (cuando el embrión es una bola de células de aspecto uniforme) esta indiferenciada, mientras que un glóbulo rojo, que sintetiza hemoglobina en el adulto, está diferenciado. ¿Cómo pasan las células de un estadio indiferenciado a otro diferenciado? El proceso implica la activación progresiva de grupos de genes diferentes en distintas células del embrión. Desde una perspectiva genética, una manera de definir la serie de tipos celulares distintos que se forman durante el desarrollo de un organismo pluricelular, es catalogar los genes que están activos en cada tipo celular. En otras palabras, el desarrollo depende de patrones de expresión génica diferencial.

La idea de que la diferenciación se consigue activando y desactivando genes en momentos diferentes y en tipos celulares diferentes, se denomina la **hipótesis de la actividad génica variable**. Las suposiciones subyacentes son, primero, que cada célula tiene un genoma completo y segundo, que la transcrip-

ción diferencial de genes seleccionados controla el desarrollo y diferenciación de cada célula. En los organismos pluricelulares, la evolución ha conservado los genes implicados en el desarrollo, los patrones de transcripción diferencial y los mecanismos de desarrollo siguientes, permitiendo el uso de organismos modelo, muy bien caracterizados genéticamente, para diseccionar el desarrollo

23.2 Conservación de los mecanismos del desarrollo y la utilización de organismos modelo

El análisis genético del desarrollo en una amplia variedad de organismos ha demostrado que solo hay un pequeño número de mecanismos de desarrollo y de sistemas de señalización utilizados por todos los organismos pluricelulares. Por ejemplo, la formación del ojo en *Drosophila* y la formación del ojo en la especie humana, esta controlado por el mismo grupo de genes que actúan mediante la misma red reguladora. De hecho, genes del ojo de ratón insertados en moscas regulan la formación del ojo en *Drosophila*! Como otro ejemplo, muchas de las diferencias en tamaño y forma entre las cebras y el pez cebra están controladas por patrones de expresión distintos de un grupo de genes, pero no por genes diferentes. Los proyectos de secuenciación de genomas han confirmado que los genes de un amplio rango de organismos se han conservado.

Aunque muchos mecanismos de desarrollo son similares entre todos los animales pluricelulares, la evolución también ha dado lugar a nuevos y diferentes planteamientos para transformar un zigoto en adulto. Esto ha implicado a varios mecanismos, como la mutación, la duplicación génica y la divergencia, la asignación de funciones nuevas a viejos genes y el reclutamiento de genes para nuevas rutas de desarrollo. Por ejemplo, la concha de las tortugas, una estructura única entre los reptiles, está formada adaptando una ruta de señalización a una nueva función. La concha se forma por el mayor crecimiento de la pared corporal dorsal bajo el control del gen del factor 10 (*FGF-10*) de crecimiento de los fibroblastos, un componente de una ruta de señalización que controla el desarrollo de otros miembros: extremidades y pulmones. Sin embargo, el énfasis en este capítulo será sobre las semejanzas entre especies.

Organismo modelo en el estudio del desarrollo

Históricamente, los genéticos han utilizado un puñado de organismos para estudiar el desarrollo. Entre estos se encuentran la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el nemátodo (*Caenorhabditis elegans*), el pez cebra (*Danio rerio*), el ratón (*Mus musculus*) y la pequeña fanerógama *Arabidopsis thaliana*. La genética de estas especies está muy bien caracterizada y se han secuenciado los genomas de todas ellas. En todas las especies se dispone de un amplio catálogo de mutantes que afectan a pasos importantes del desarrollo y hay procedimientos muy bien establecidos para obtener y mantener nuevas cepas mutantes. Con la excepción de las plantas, todas estas especies comparten rutas de regulación génica y mecanismos de desarrollo con los humanos. La utilización de estos organismos ha ayudado a identificar genes que controlan trastornos en el desarrollo humano y proporcionan ideas de las interacciones entre los genes y el ambiente que afectan al resultado de pasos clave del desarrollo.

Análisis de los mecanismos de desarrollo

A lo largo de este capítulo no podemos revisar todos los aspectos del desarrollo, ni explorar el análisis genético de todos los mecanismos del desarrollo puestos en marcha por la fusión de esperma y óvulo. Nos fijaremos en tres procesos generales del desarrollo: la especificación del eje corporal, el programa de expresión génica que transforma células no diferenciadas en diferenciadas y el papel en el desarrollo de la comunicación entre células. Entrelazado con la discusión de estos mecanismos habrá otros temas: el papel de los genes conmutadores maestros en el control de las rutas de desarrollo, los componentes citoplásmicos del oocito que controlan los patrones de transcripción tempranos, cómo quedan determinadas las células para formar estructuras adultas y los patrones de los sistemas genéticos de señalización que alteran los patrones de la expresión génica.

Utilizaremos tres sistemas modelo: *D. melanogaster*, *C. elegans* y *A thaliana* para ilustrar estos tres procesos de desarrollo y los temas relacionados. La programación de células para una ruta de desarrollo específica implica a menudo la acción de un gen maestro que actúa como un interruptor binario. Introduciremos este tema antes de examinar el papel de la expresión génica diferencial en la restricción progresiva de las opciones de desarrollo que conducen a la formación del eje corporal. Luego ampliaremos la discusión para incluir la selección de rutas que dan lugar a células diferenciadas en vegetales y en animales y a considerar el papel de la comunicación entre células en el desarrollo. Finalmente, el capítulo concluirá con una discusión de la más dramática limitación del destino celular en el desarrollo, es decir, la muerte celular programada (apoptosis).

Conceptos básicos en genética del desarrollo

En los eucariotas superiores, el desarrollo comienza con la formación del zigoto, una célula originada por la fusión del esperma y del óvulo. El oocito es una célula con un citoplasma heterogéneo y una distribución no uniforme de sus componentes. Después de la fecundación y de las primeras divisiones celulares, los núcleos de las células hijas se encuentran en ambientes distintos a medida que el citoplasma materno se ha distribuido en las nuevas células. Las pruebas sugieren que en células distintas, el citoplasma ejerce influencia diferente sobre el material genético, dando lugar a transcripción diferencial en momentos concretos del desarrollo. Por ello, la localización del citoplasma o la herencia de componentes citoplásmicos concretos por células embrionarias, juega un papel regulador im-

portante en el desarrollo. Los primeros productos génicos sintetizados por el genoma del zigoto, alteran el citoplasma de cada célula, produciendo un ambiente celular diferente que, a su vez, da lugar a la activación de otros genes y así sucesivamente. A medida que el número de células del embrión aumenta, se influyen por interacciones de célula a célula. Por consiguiente, los factores ambientales que actúan sobre el material genético incluyen ahora al citoplasma de cada célula, así como a las señales de otras células. Aunque en la embriogénesis temprana muchas células no muestran evidencias de especialización estructural o funcional, la combinación de sus componentes citoplásmicos localizados y de su posición en el embrión en desarrollo determina la estructura y función últimas que asumirán. Es como si su destino hubiera sido programado antes de los sucesos que realmente le llevan a la especialización.

A medida que las células embrionarias responden a su ambiente interno y externo continuamente cambiante, se embarcan en una ruta de desarrollo. La selección de una ruta de desarrollo específica para una célula implica a menudo la acción de un gen maestro que inicia una cascada de expresión por otros genes.

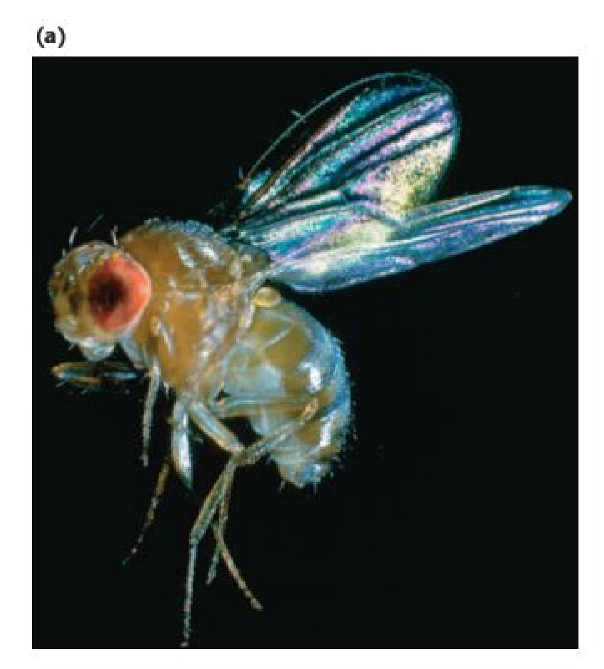
23.3 Los genes conmutadores maestros programan la expresión del genoma

Como parte de la restricción progresiva de la actividad transcripcional que acompaña al desarrollo, ciertos genes actúan como conmutadores, disminuyendo el número de rutas de desarrollo alternativas que puede seguir la célula. Cada punto de decisión es normalmente binario —es decir, hay dos destinos de desarrollo alternativos para una célula en un momento dado— y la acción de un gen conmutador programa a la célula para seguir sólo una de estas rutas. A estos genes se les llama **genes reguladores maestros** o **genes conmutadores binarios**. Su definición tiene que ver con su capacidad para iniciar el desarrollo completo de un órgano o de un tipo de tejido. Describiremos brevemente cómo un gen conmutador binario controla la formación del ojo y cómo esta ruta reguladora es utilizada en todos los organismos con ojos.

El control de la formación del ojo

Los adultos de *Drosophila* tienen ojos compuestos que se desarrollan en los estadios preadultos [Figura 23.2(a)]. En moscas homozigotas para el alelo recesivo *eyeless*, el desarrollo del ojo es anormal y los adultos no tienen ojos [Figura 23.2(b)]. La proteína codificada por el alelo silvestre actúa muy tempranamente en el desarrollo y se expresa en todas las células que darán lugar al ojo. En mutantes de pérdida de función, las células normalmente destinadas a formar parte del ojo degeneran más tarde en el desarrollo, sufren apoptosis (que se discute al final de este capítulo) y los ojos no se forman. El gen *eyeless* es uno de los siete genes que controlan la formación del ojo en *Drosophila*. Las mutaciones de pérdida de función de cualquiera de estos genes da lugar a adultos sin ojos. Debido a que *eyeless* es el primer gen de esta serie que se expresa durante el desarrollo, ha sido apellidado el regulador maestro del desarrollo del ojo. El gen *eyeless* codifica un factor de transcripción y se

(a)



(b)

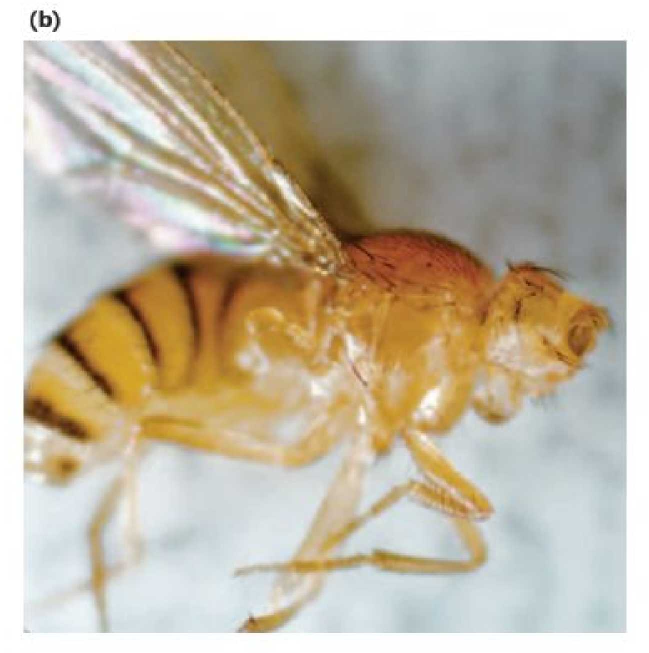


FIGURA 23.2 (a) El ojo compuesto normal de *Drosophila* adulta. (b) En moscas homozigotas para el mutante *eyeless* (*ey*), el desarrollo del ojo es anormal y los adultos no tienen ojos. El gen *ey* es un regulador maestro del desarrollo del ojo en todos los animales.

considera un gen regulador maestro o conmutador binario porque opera al principio de la ruta de desarrollo y activa la expresión de otros genes que también codifican factores de transcripción. La activación de estos genes conduce a la expresión de un gran grupo de genes que controlan el desarrollo y diferenciación del ojo del adulto.

La expresión de *eyeless* en otros órganos, como en las patas, alas o antenas, da lugar a la producción de ojos en otras localizaciones [Figura 23.3(a)]. Esto indica que *eyeless* inicia el programa de expresión génica para la formación del ojo en células que normalmente no forman ojos y es capaz de anular el programa de determinación y diferenciación que se encuentra en estas células.

El gen *eyeless* es parte de una red de siete genes [Figura 23.3(b)]. Esta red se considera el regulador maestro de la formación del ojo. Algunos de los genes de la red son necesarios para la expresión de otros genes, mientras que otros refuerzan la transcripción de los miembros de la red, y otros son responsables del crecimiento del ojo.

El gen *eyeless* y los otros genes de esta red son importantes debido a que este grupo de genes se ha conservado a lo largo de la evolución y es utilizado por todos los animales, incluida la especie humana, para fabricar ojos. En la Tabla 23.1 se comparan los genes humanos y los de la mosca. El descubrimiento de que *eyeless* dirige la formación del ojo en los vertebrados ha forzado a reevaluar la creencia largo tiempo mantenida de que los ojos compuestos de los insectos y los ojos de los vertebrados, con una sola lente, evolucionaron separadamente. Tal suposición se basaba en la observación de que el ojo compuesto de los insectos y el ojo cámara de los vertebrados tienen diferentes orígenes embrionarios, se desarrollan por rutas diferentes y son estructuralmente muy distintos.

En 1995, Walter Gehring y colegas obtuvieron moscas transgénicas que llevaban copias del homólogo de *eyeless* del ratón. Los resultados fueron notables y dieron lugar a dos conclusiones ineludibles. Primero, este gen conmutador pudo disparar la formación de ojos extra en las alas, antenas y patas de la mosca [Figura 23.3(a)], y segundo, ya que el gen del ratón funciona en

TABLA 23.1

Genes de vertebrados	Homólogos en *Drosophila*	Expresión en el ojo de los vertebrados	Pérdida de función
Pax6	*eyeless, twin of eyeless*	Cristalino en placa, vesícula óptica	Aniridia (humanos), *small eye* (ratón)
Bmp4	*dpp*	Vesícula óptica, ectodermo de la cabeza	Sin cristalino (ratón)
Bmp7	*60A*	Vesícula óptica, ectodermo de la cabeza	Sin cristalino (ratón)
Eyal	*eyes absent*	Mesénquima perióptico, expresión débil de las lentes	Sin ojos (humano) o (ratón), algunas mutaciones en humanos dan lugar a cataratas y a defectos precedentes
Six3	*sine oculis*	Cristalino en placa, vesícula óptica	Ojos muy pequeños (humanos)
Optx2	*optix*	Vesícula óptica	Sin ojos (humanos)
Dach1	*dachshund*	Vesícula óptica	*n.d.

*n.d., no determinado.
Fuente: Wawersik, S. and Maas, R.L. 2000. Vertebrate eye development as modelled in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet*. 9:917-925, Table 1, p. 921.

(a)



(b)

toy
ey *eyg*
so *eya*
dac

FIGURA 23.3 (a) Formación de ojos en moscas transgénicas que llevan el homólogo de eyeless del ratón. Se forman ojos completos en localizaciones ectópicas, como en la pata. (b) La red de genes que regula la formación del ojo en *Drosophila*.

las moscas, los ojos de invertebrados y vertebrados *son* de hecho homólogos a nivel molecular. Por consiguiente, estos ojos están relacionados evolutivamente. Las dianas corriente abajo de estos factores de transcripción también se conservan, indicando que los pasos de la regulación genética del desarrollo del ojo están compartidos por especies que divergieron hace unos 500 millones de años (a partir de un antecesor común sin ojos). Esta conservación evolutiva hace posible la utilización del análisis genético en *Drosophila* para estudiar el desarrollo de los ojos en la especie humana y para entender las bases moleculares de los defectos oculares hereditarios.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué pruebas relacionan la formación del ojo en humanos y otros vertebrados con la formación del ojo en invertebrados como *Drosophila*?

23.4 Genética del desarrollo embrionario de *Drosophila*: especificación del eje corporal

Por qué ciertas células activan o desactivan genes específicos en momentos específicos del desarrollo, es una cuestión central en la biología del desarrollo. En la actualidad no hay una respuesta sencilla a esta pregunta. Sin embargo, la información que procede del estudio de organismos modelo nos da un punto de partida. En particular, el análisis genético y molecular del desarrollo embrionario de *Drosophila* señala el papel clave durante la oogénesis de componentes moleculares situados en el citoplasma del oocito sobre el control de la expresión génica.

Generalidades del desarrollo de *Drosophila*

Empezando con el huevo fecundado, *Drosophila* pasa por un período de desarrollo preadulto con cinco fases diferentes: el embrión, tres estadios larvarios y el estadio de pupa. La mosca adulta emerge de la cubierta pupal unos 10 días después de la fecundación (Figura 23.4). Externamente, el huevo de *Drosophila* tiene varias estructuras que delimitan las regiones anterior, posterior, dorsal y ventral (Figura 23.5). El extremo anterior del huevo contiene el micrópilo, una estructura cónica especializada utilizada para la entrada del esperma en el huevo, mientras que el extremo posterior está rodeado y marcado por una serie de aerópilos (aberturas que permiten el intercambio de gases durante el desarrollo). La parte dorsal del huevo es aplanada y contiene los apéndices coriónicos, mientras que la cara ventral es curvada. Internamente, el citoplasma del huevo está organizado en una serie de gradientes moleculares de origen materno. Estos gradientes desempeñan un papel clave al establecer los destinos del desarrollo de los núcleos que emigran a regiones específicas del embrión.

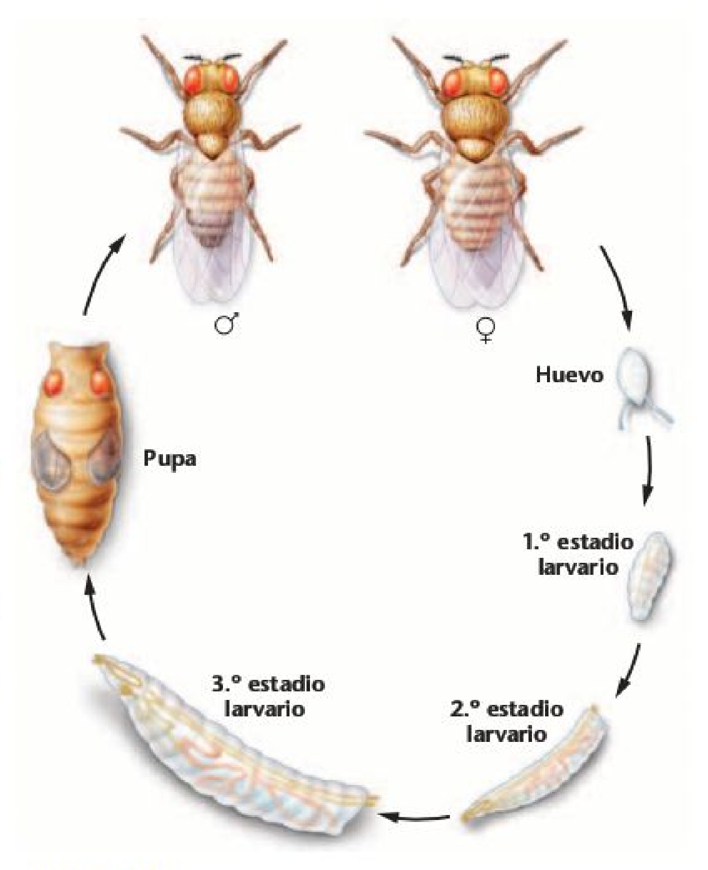


FIGURA 23.4 Ciclo biológico de *Drosophila*.

Inmediatamente después de la fecundación, el núcleo del zigoto experimenta una serie de divisiones sin citocinesis [Figura 23.6(a) y (b)]. Después de nueve ciclos de división, el citoplasma del zigoto alberga aproximadamente 512 núcleos en una

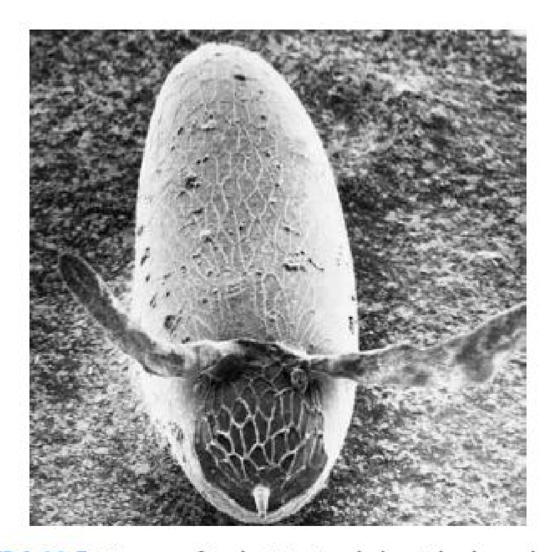


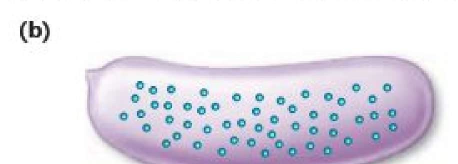
FIGURA 23.5 Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *Drosophila* recién puesto. El micropilo es la pequeña proyección blanca en el extremo anterior (abajo). La superficie dorsal (con los dos apéndices coriónicos) está boca arriba.

(a)



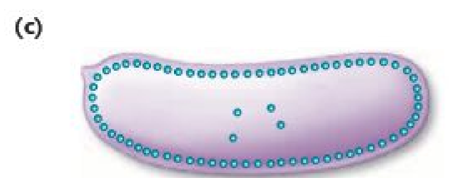
El núcleo diploide del zigoto se produce por la fusión de los núcleos gaméticos paternos.

(b)



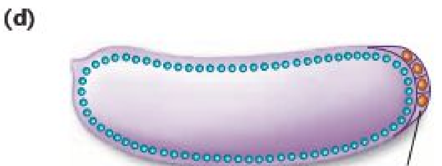
Nueve ciclos de división nuclear producen un sincitio plurinucleado.

(c)



Los núcleos emigran a la superficie exterior.

(d)



Las células polares se forman en el polo posterior (precursoras de las células germinales).

En la superficie de la célula se producen unas cuatro divisiones más.

(e)



Los núcleos se rodean de membrana, formando una monocapa de células en la superficie del embrión.

FIGURA 23.6 Estadios iniciales del desarrollo de *Drosophila*. (a) Huevo fecundado con el núcleo zigótico, unos 30 minutos después de la fecundación. (b) Las divisiones nucleares se dan cada 10 minutos, produciéndose una célula plurinucleada, el blastodermo sincitial. (c) Después de unas 9 divisiones (512 núcleos), los núcleos emigran a la superficie exterior o córtex del óvulo. (d) En la superficie se producen cuatro ciclos más de división nuclear. Unas 2,5 horas después de la fecundación, en el polo posterior se forma un pequeño grupo de células, las células polares. Estas células formarán las células germinales del adulto. (e) Unas 3 horas después de la fecundación, los núcleos se rodean de membrana, formando una monocapa de células en la superficie del embrión, dando lugar al blastodermo celular.

sola célula. Los núcleos emigran hacia la superficie exterior del huevo, o córtex, donde se producen más divisiones [Figura 23.6(c) y (d)] que forman el blastodermo sincitial (un sincitio es cualquier célula con más de un núcleo). Dispuestos alrededor de la periferia del huevo, los núcleos se rodean de citoplasma que contiene gradientes localizados de transcritos y proteínas de origen materno. En los núcleos se inician programas de expresión génica, bajo el control de estos componentes citoplásmicos, dando lugar a programas de desarrollo diferentes en diferentes células.

La formación de las células germinales en el polo posterior del embrión demuestra el papel regulador de estos componentes citoplásmicos localizados [Figura 23.6(d) y (e)]. Los experimentos han demostrado que cualquier núcleo situado en el citoplasma posterior (el polo plasmático) formará células germinales. Por ello, el citoplasma del polo posterior tiene componentes maternos que dirigen a los núcleos para formar células germinales. Los programas transcripcionales puestos en marcha en el resto de los núcleos que han emigrado forman los ejes de simetría antero-posterior y dorso-ventral.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que el citoplasma del huevo de *Drosophila* tiene componentes maternos organizados en gradientes y zonas de concentración desigual?

Genes que regulan la formación del eje corporal antero-posterior

Después de la formación del blastodermo sincitial, se forman membranas plasmáticas alrededor de los núcleos, dando lugar al blastodermo celular [Figura 23.6(e)]. Más tarde, el embrión queda organizado en una serie de segmentos definidos por los patrones de expresión de varios genes embrionarios (Figura 23.7). Más adelante, estos dan lugar a los segmentos del adulto, aunque están ligeramente desplazados. Dentro de los segmentos, las células quedan determinadas primero para formar el compartimento del segmento anterior o posterior. En estadios posteriores, las opciones de desarrollo de una célula se restringen más, de tal manera que todas las células de un compartimento son programadas finalmente para formar una sola estructura en el organismo adulto.

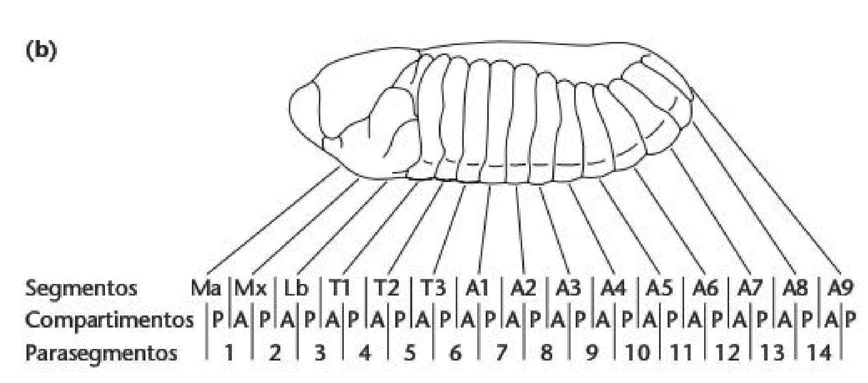
La organización completa del plan corporal del adulto de *Drosophila* deriva del plan corporal de la larva y está compuesto por la cabeza, los segmentos torácicos y los abdominales. Gran parte de las estructuras larvarias se degradan durante el estadio pupal, y la mayoría de las estructuras corporales del adulto se forman a partir de pequeñas agrupaciones celulares denominadas **discos imaginales**, formados durante los estadios larvarios. Hay 12 pares de discos bilaterales —discos del ojo-antena, discos de las patas, discos de las alas y así sucesivamente— y



(a)



(b)



(c)

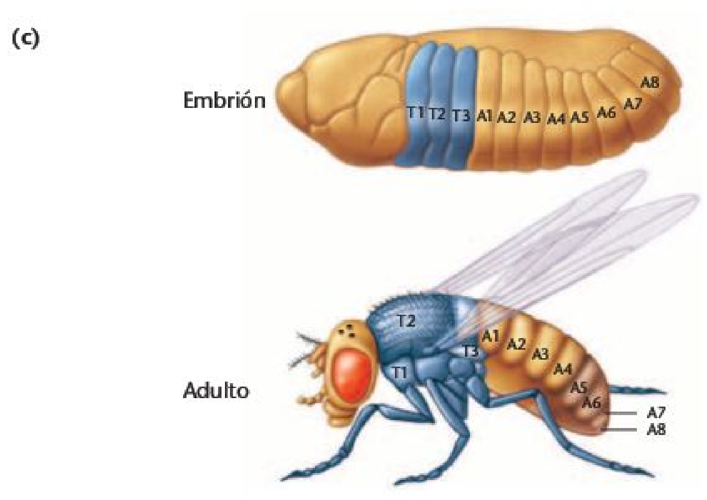


FIGURA 23.7 Segmentación en *Drosophila*. (a) Micrografía electrónica de barrido de un embrión de *Drosophila* unas 10 horas después de la fecundación. En este estadio, el patrón de segmentación del cuerpo está claramente establecido. (b) Segmentos, compartimentos y parasegmentos del embrión de *Drosophila*. Ma, Mx y Lb representan los segmentos que formarán las estructuras cefálicas. T1-T3 son los segmentos torácicos y A1-A9 son los segmentos abdominales. Cada segmento se divide en un compartimento anterior (A) y otro posterior (P). Los parasegmentos representan una especificación inicial del patrón que después se refina en el diseño segmentado del plan corporal. Obsérvese que todos los parasegmentos están desplazados hacia delante un compartimento para formar los segmentos. (c) El embrión segmentado y las estructuras del adulto que se formarán de cada segmento.

un disco genital. En la Figura 23.8 se muestra qué disco imaginal dará lugar a cuál estructura del adulto.

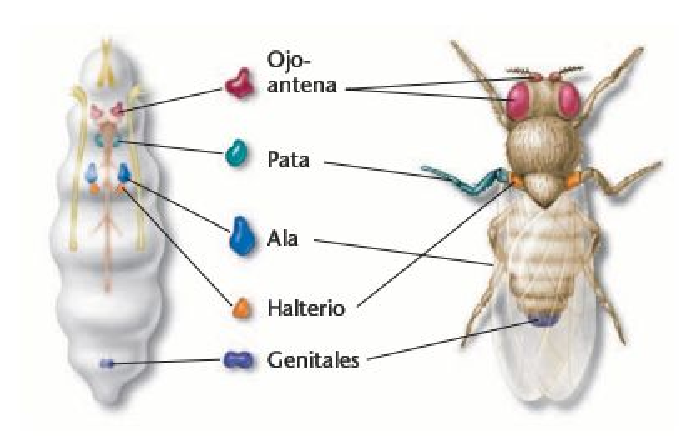


FIGURA 23.8 Discos imaginales de la larva de *Drosophila* y las estructuras adultas que derivan de ellos.

Análisis genético de la embriogénesis

El conocimiento del desarrollo anatómico de *Drosophila* ha sido útil, pero el análisis genético ha proporcionado una abundante información de los sucesos de la embriogénesis. Los genes que controlan el desarrollo embrionario son de dos clases: genes de efecto materno y genes zigóticos. Los productos de los genes de efecto materno (mRNA y/o proteínas) se depositan en el óvulo en desarrollo durante la oogénesis. Muchos de estos productos se distribuyen en un gradiente o se concentran en regiones específicas del citoplasma del óvulo. Las hembras que llevan mutaciones deletéreas en genes de efecto materno son estériles, ya que ninguno de los embriones de hembras homozigotas para una mutación recesiva recibirá productos génicos de tipo silvestre de su madre, y por tanto no se desarrollarán con normalidad. En *Drosophila*, estos genes de efecto materno codifican factores de transcripción, receptores y proteínas que regulan la transcripción. Durante el desarrollo

embrionario, estos productos génicos activan o reprimen la expresión del genoma del zigoto en una secuencia temporal y espacial.

Los genes zigóticos se expresan en el embrión en desarrollo y por consiguiente se transcriben después de la fecundación. El fenotipo de las moscas de esta clase con mutaciones deletéreas es letalidad embrionaria. En un cruce entre dos moscas heterozigotas para una mutación zigótica recesiva, una cuarta parte de los embriones (los homozigotos) no se desarrollarán normalmente y morirán. En *Drosophila*, muchos de los genes zigóticos se transcriben en regiones específicas del embrión que dependen de la distribución de las proteínas de efecto materno.

Mucho de lo que se conoce de los genes zigóticos que regulan el desarrollo viene de un análisis mutagénico realizado por Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus, que rastrearon sistemáticamente mutaciones que afectasen al desarrollo embrionario. Examinaron miles de embriones muertos de moscas mutagenizadas, buscando mutaciones letales recesivas embrionarias con defectos en las estructuras externas. Así se identificaron a los padres como portadores de estas mutaciones, que se agruparon en tres clases: *genes gap, genes de la regla par* y *genes de la polaridad de los segmentos*. En un artículo publicado en 1980, estos dos científicos propusieron un modelo en el que el desarrollo embrionario se inicia mediante gradientes de productos de genes de efecto materno. Dos grupos de genes zigóticos interpretan la información posicional delineada por los gradientes moleculares a lo largo del eje antero-posterior del embrión: (1) aquellos identificados en su investigación —genes gap, genes de la regla par y genes de la polaridad de los segmentos— llamados en conjuntos **genes de segmentación** (estos genes dividen al embrión en una serie de bandas o segmentos y definen el número, el tamaño y la polaridad de cada segmento) y (2) los genes homeóticos, que especifican la identidad y el destino de cada segmento (Figura 23.9).

El modelo desarrollado por Nüsslein-Volhard y Wieschaus se muestra en la Figura 23.10. El proceso de desarrollo comienza con los productos de genes de efecto materno, responsables de la formación del eje antero-posterior, que se situaron en el óvulo durante la oogénesis y que son inmediatamente activados después de la fecundación [Figura 23.10(a)]. Su actividad restringe a las células a formar estructuras anteriores o posteriores. Los productos génicos de estos gradientes activan la transcripción de los genes gap, que dividen al embrión en un número limitado de regiones amplias [Figura 23.10(b)]. Las proteínas gap son factores de transcripción que activan los genes de la regla par, cuyos productos dividen al embrión en regiones más pequeñas de cerca de dos segmentos de anchura [Figura 23.10(c)]. La acción combinada de todos los genes gap definen los límites de los segmentos. A su vez, los genes de la regla par activan a los genes de la polaridad de los segmentos, que luego dividen a los segmentos en compartimentos anterior y posterior [Figura 23.10(d)]. La acción conjunta de los genes

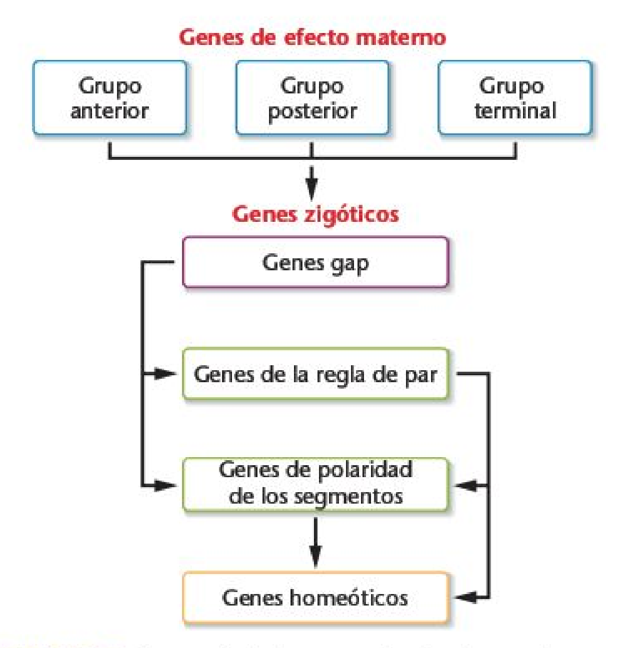


FIGURA 23.9 Jerarquía de los genes implicados en el establecimiento de plan corporal segmentado de *Drosophila*. Los productos génicos de los genes maternos regulan la expresión de los primeros tres grupos de genes zigóticos (gap, de la regla para y de la polaridad de los segmentos), que a su vez controlan la expresión de los genes homeóticos.

maternos que forman el eje antero-posterior y los genes de segmentación, definen los campos de acción de los genes homeóticos (*Hox*) [Figura 23.10(e)].

En un segundo rastreo, Eric Wieschaus y Trudi Schüpbach examinaron miles de moscas buscando mutaciones de efecto materno que afectasen a estructuras externas del embrión. Estimaron que hay unos 40 genes de efecto materno y unos 50 a 60 genes zigóticos que regulan el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Esto significa que el desarrollo embrionario normal está controlado por solo unos 100 genes, un número sorprendentemente bajo dada la complejidad de las estructuras que se forman a partir del óvulo fecundado. Por sus investigaciones sobre el control genético del desarrollo en *Drosophila*, Nüsslein-Volhard y Wieschaus, y E.B. Lewis, —el genético que identificó y estudio inicialmente muchos de estos genes en la década de 1970— fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1995.

Ahora resuelva esto

El Problema 23.7 de la página 700 se refiere al rastreo de mutantes que afectan a las estructuras externas del embrión.

Sugerencia: Para reconciliar los resultados de su estudio con las conclusiones de Wieschaus y Schüpbach, recuerde las diferencias entre genes y alelos.

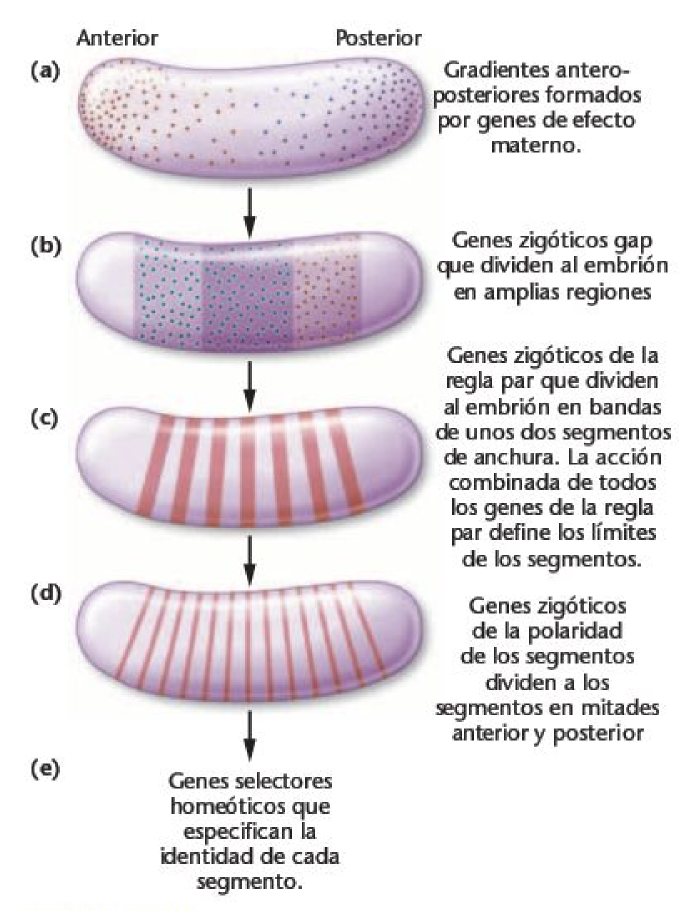


FIGURA 23.10 Restricción progresiva de los destinos celulares durante el desarrollo en *Drosophila*. A lo largo del eje antero-posterior del embrión se establecen gradientes de proteínas maternas. (b), (c) y (d) Tres grupos de genes de segmentación que definen progresivamente los segmentos corporales. e) Los genes homeóticos dan identidad a cada segmento.

23.5 Los genes zigóticos programan la formación de segmentos en *Drosophila*

Los genes zigóticos se activan o se reprimen según el gradiente posicional de los productos de los genes de efecto materno. La expresión de tres subgrupos de estos genes dividen al embrión en una serie de segmentos a lo largo del eje antero-posterior. Estos genes de segmentación se transcriben normalmente en el embrión en desarrollo y sus mutaciones tienen fenotipos letales embrionarios.

Se han identificado unos 20 loci de segmentación (Tabla 23.2). Se clasifican de acuerdo con sus fenotipos mutantes: (1) los genes gap eliminan un grupo de segmentos adyacentes, (2) los genes de la regla par afectan a segmentos alternos y eliminan una parte de cada segmento afectado y (3) los genes de la polaridad de los segmentos causan defectos en las porciones homólogas de cada segmento. Examinaremos cada grupo con cierto detalle.

TABLA 23.2 GENES DE LA SEGMENTACIÓN EN *DROSOPHILA*

Genes gap	Genes de la regla par	Genes de la polaridad de los segmentos
Krüppel	*hairy*	*engrailed*
knirps	*even-skipped*	*wingless*
hunchback	*runt*	*cubitis interruptus^D*
giant	*fushi-tarazu*	*hedgehog*
tailless	*odd-paired*	*fused*
buckebein	*odd-skipped*	*armadillo*
	sloppy-paired	*patched*
		gooseberry
		paired
		naked
		disheveled

Genes gap

La transcripción de los genes gap es activada o inactivada por productos génicos que se han expresado previamente a lo largo del eje antero-posterior y por otros genes del sistema de gradiente materno. Cuando mutan, estos genes producen grandes huecos en el patrón de segmentación del embrión. Los mutantes *hunchback* pierden las estructuras cefálicas y torácicas, los mutantes *Krüppel* pierden las estructuras torácicas y abdominales, y los mutantes *knirps* pierden la mayoría de las estructuras abdominales. La transcripción de los genes gap divide al embrión en una serie de grandes regiones (la cabeza, el tórax y el abdomen). Dentro de estas regiones, combinaciones diferentes de actividad génica especificarán finalmente, tanto el tipo de segmentos que se formará como el orden correcto de los segmentos en el cuerpo de la larva, de la pupa y del adulto. Hasta la fecha, todos los genes gap que se han clonado codifican factores de transcripción con motivos de unión al DNA de dedos de zinc. La expresión de los genes gap se correlaciona, en términos generales, con los fenotipos mutantes: *hunchback* en áreas anteriores, *Krüpel* en áreas intermedias y *knirps* en áreas posteriores (Figura 23.11). Los genes gap controlan la transcripción de los genes de la regla par.

Genes de la regla par

Los genes de la regla par dividen las amplias regiones establecidas por los genes gap en regiones con la anchura aproximada de un segmento. Las mutaciones en los genes de la regla par eliminan regiones del tamaño de un segmento en segmentos alternos. Los genes de la regla par se expresan en bandas o líneas estrechas de núcleos que se extienden en círculo alrededor del embrión. La expresión de este conjunto de genes establece, primero, los límites de los segmentos y luego el destino del desarrollo de las células dentro de cada segmento, controlando los genes de la polaridad de los segmentos. Hay al menos ocho

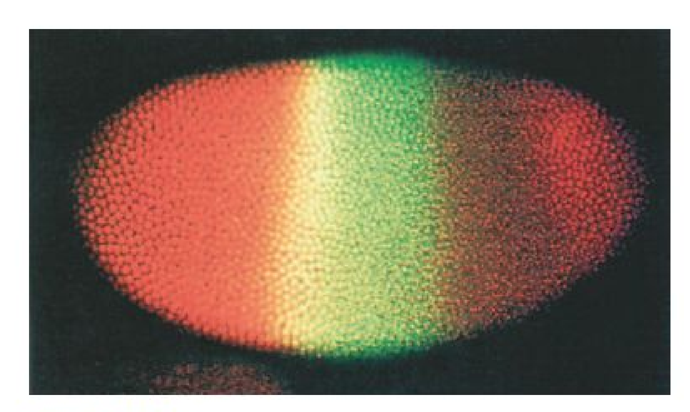


FIGURA 23.11 Expresión de varios genes gap en un embrión de *Drosophila*. La proteína hunchback se presenta en naranja y la krüppel se indica en verde. La banda amarilla se origina cuando las células tienen proteínas *hunchback* y *krüppel*.

genes de la regla par que actúan dividiendo el embrión en una serie de bandas. Sin embargo, los límites de estas bandas se solapan, lo que significa que las células de las bandas expresan combinaciones diferentes de genes de la regla par de manera solapada (Figura 23.12). Muchos de los genes de la regla par codifican factores de transcripción que contienen homeodominios hélice-giro-hélice. La acción de los productos de los genes gap media la transcripción de los genes de la regla par, pero el patrón se resuelve en bandas altamente delineadas mediante la interacción entre los propios productos génicos de los genes de la regla par (Figura 23.13).

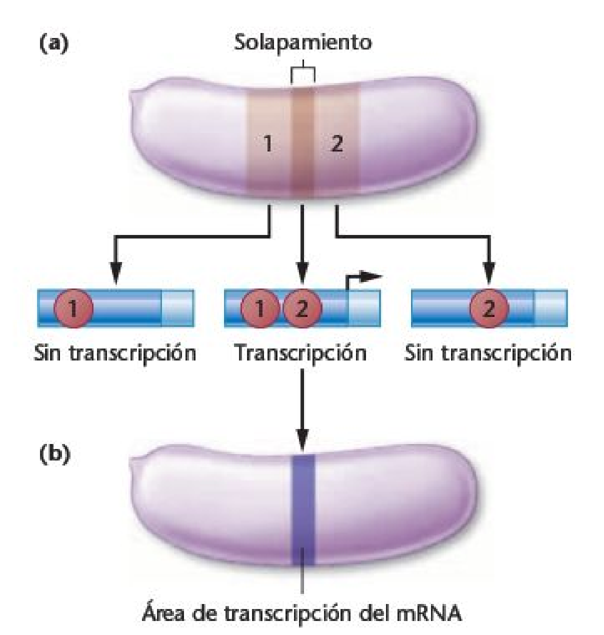
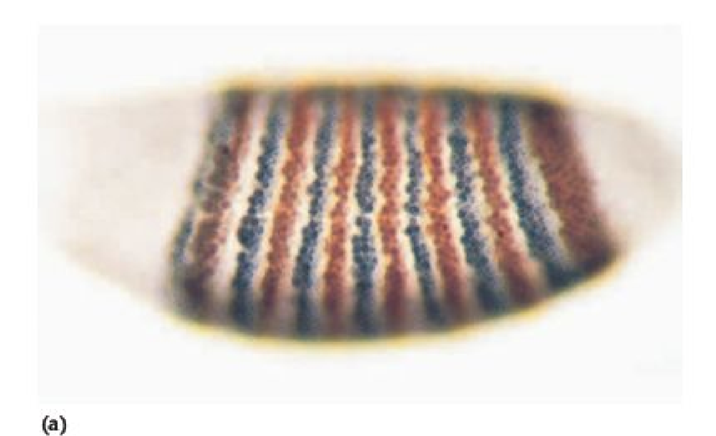


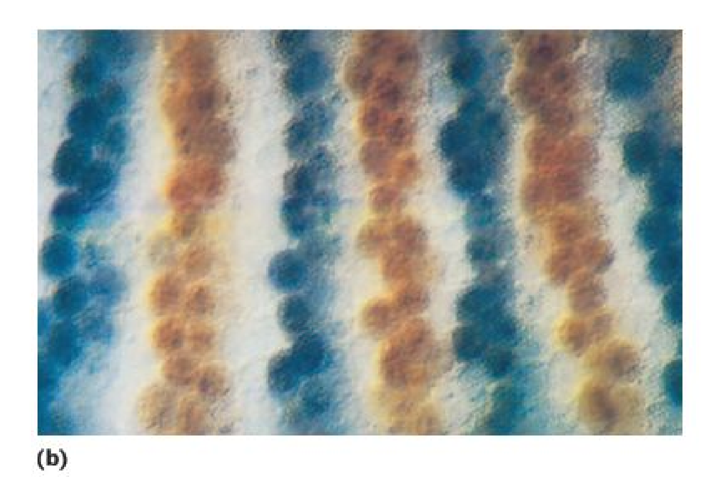
FIGURA 23.12 Se pueden generar nuevos patrones de expresión génica solapándose regiones que contengan dos productos génicos diferentes. (a) La transcripción de los factores 1 y 2 se encuentran en una región de expresión solapada. Si ambos factores de transcripción tienen que unirse al promotor de un gen diana para disparar su expresión, el gen se activará sólo en las células que tengan ambos factores (muy probablemente en la zona de solapamiento). (b) La expresión del gen diana en la región restringida del embrión

Genes de la polaridad de los segmentos

Los factores de transcripción codificados por los genes de la regla par controlan la expresión de los genes de la polaridad de los segmentos. Cada gen de la polaridad de los segmentos se activa en una única banda de células dentro de cada segmento, que se extiende alrededor de la circunferencia del embrión (Figura 23.14). Esto divide el embrión en 14 segmentos y los productos de los genes de la polaridad de los segmentos controlan la identidad celular dentro de cada segmento. Algunos de los genes de la polaridad de los segmentos, como *engrailed*, codifican factores de transcripción. Sin embargo, la proteína *engrailed*, en lugar de activar la transcripción, inhibe la activación por competición con otras proteínas con dominio homeótico, lo que resulta en el establecimiento de un límite de segmento.



(a)



(b)

FIGURA 23.13 Patrón de bandas de la expresión de los genes de la regla par en un embrión de *Drosophila*. Este embrión está teñido para mostrar los patrones de expresión de los genes *even-skipped* y *fushi-tarazu*; (a) vista a poco aumento, y (b) vista a gran aumento del mismo embrión.

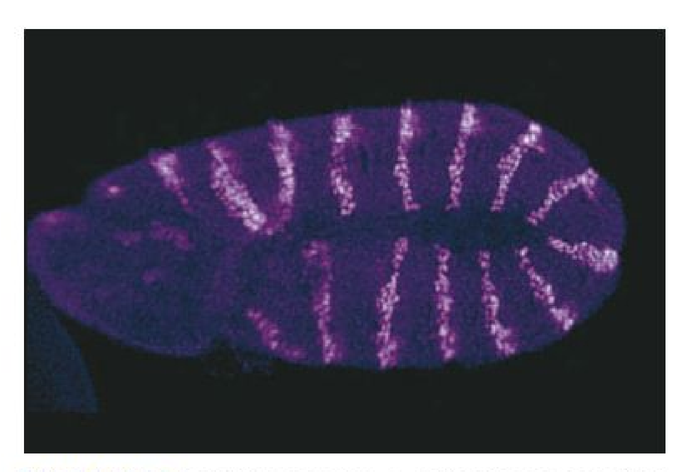


FIGURA 23.14 Las 14 bandas de expresión del gen *engrailed* de la polaridad de los segmentos en un embrión de *Drosophila*.

23.6 Los genes homeóticos controlan el destino de desarrollo de los segmentos a lo largo del eje antero-posterior

Al establecerse los límites de los segmentos mediante la acción de los genes de segmentación, se activan los genes homeóticos como dianas de genes zigóticos. La expresión de los genes homeóticos determina las estructuras del adulto que se formarán en cada segmento corporal. En *Drosophila*, estas incluyen la antena, partes de la boca, las patas, alas, tórax y abdomen. Los mutantes de estos genes se denominan **mutantes homeóticos**, debido a que la estructura formada por un segmento se transforma de tal manera que es el mismo que el segmento vecino. Por ejemplo, el alelo silvestre del gen *Antennapedia* (*Antp*) especifica la formación de una pata en el segundo segmento torácico. Las mutaciones *Antp* dominantes de ganancia de función hacen que este gen se exprese también en la cabeza y las moscas mutantes tienen una pata en su cabeza en el lugar de la antena (Figura 23.15).

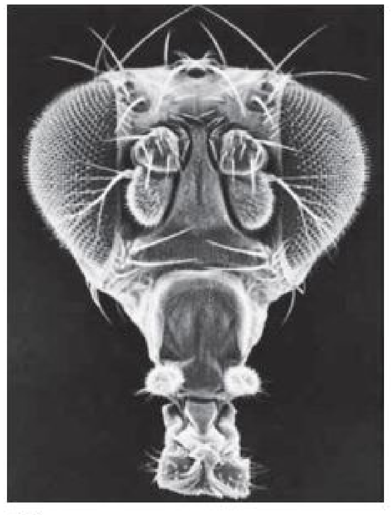
Genes *Hox* en *Drosophila*

En el genoma de *Drosophila* hay dos grupos de genes *Hox* en el cromosoma 3 (Tabla 23.3). Un grupo, el complejo *Antennapedia* (*Antp-C*), tiene cinco genes que especifican estructuras en la cabeza y en los dos primeros segmentos torácicos (Figura 23.16). El segundo grupo, el complejo *bithorax* (*BX-C*), tiene tres genes que especifican estructuras en la parte posterior del segundo segmento torácico, en todo el tercer segmento torácico, y en los segmentos abdominales (Figuras 23.16).

Los genes *Hox* tienen dos propiedades en común. Primero, cada gen *Hox* (enumerados en la Tabla 23.3) codifica un factor de transcripción, que incluye un dominio de 180 pb de unión al DNA, conocido como una **caja homeótica (*homeobox*)**. (*Hox* es la contracción de homeobox.) La homeobox codifica una secuencia de 60 aminoácidos denominada **dominio homeótico (homeodominio)**. Segundo, la expresión de los genes es colinear. Los genes del extremo 3′ de un grupo se expresan en el extremo anterior del embrión y los genes del

TABLA 23.3 GENES *HOX* DE *DROSOPHILA*

Complejo *Antennapedia*	Complejo *Bithorax*
labial	*Ultrabithorax*
Antennapedia	*abdominal A*
Sex combs reduced	*Abdominal B*
Deformed	
proboscipedia	

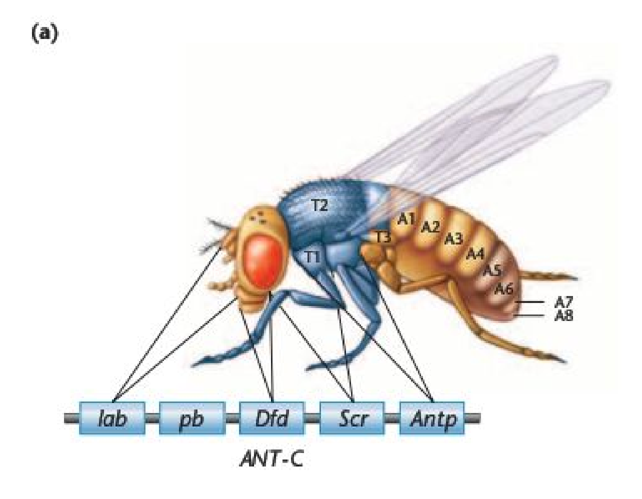


(a)



(b)

FIGURA 23.15 La mutación *Antennapedia (Antp)* de *Drosophila*. (a) Cabeza de *Drosophila* de tipo silvestre, mostrando las antenas y otras partes de la cabeza. (b) Cabeza de un mutante *Antp*, mostrando la sustitución de las antenas normales por patas. Esto está provocado por la activación del gen *Antp* en la región de la cabeza.



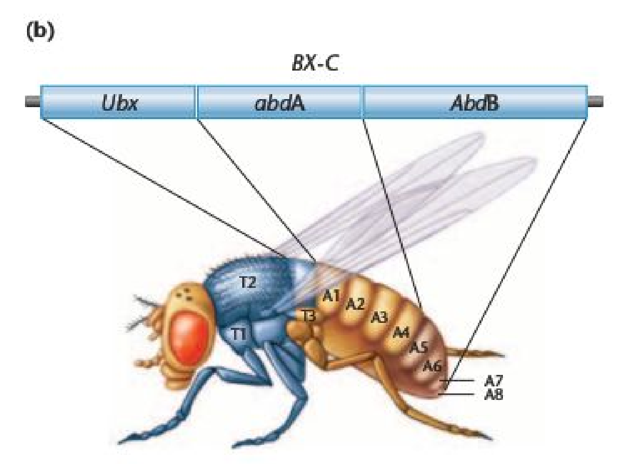


FIGURA 23.16 Genes del complejo *Antennapedia* y las estructuras del adulto que especifican. (a) En el complejo *ANT-C*, los genes *labial* (*lab*) y *Deformed* (*Dfd*) controlan la formación de los segmentos de la cabeza. Los genes *Sex comb reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*) especifican la identidad de los dos primeros segmentos torácicos. El restante gen del complejo, *proboscipedia (pb)*, podría no actuar durante la embriogénesis, pero podría ser necesario para mantener el estado diferenciado en los adultos. (b) En el complejo *BX-C*, *Ultrabithorax* (*Ubx*) controla la formación de las estructuras del compartimento posterior de T2 y las estructuras de T3. Los otros dos genes, *abdominal A* (*abdA*) y *Abdominal B* (*AbdB*) especifican las identidades de los ocho segmentos abdominales (A1-A8).

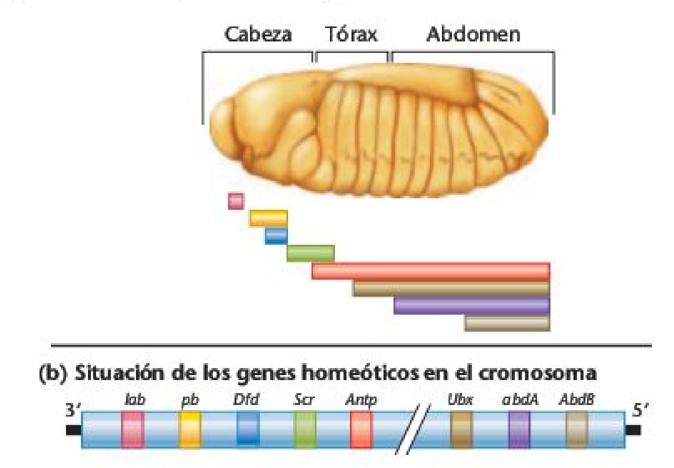


FIGURA 23.17 Las relaciones colineares entre el patrón espacial de expresión y la situación de los genes homeóticos de *Drosophila* en el cromosoma. (a) Embrión de *Drosophila* y los dominios de la expresión de los genes homeóticos en la epidermis y en el sistema nervioso central del embrión. (b) Situación en el cromosoma de los genes homeóticos. Advierta que el orden de los genes en el cromosoma está correlacionado con los límites secuenciales anteriores de sus dominios de expresión.

extremo 5′ se expresan en la región posterior (Figura 23.17). Aunque los genes *Hox* se identificaron primero en *Drosophila*, se encuentran en los genomas de la mayoría de los eucariotas con plan corporal segmentado, como el pez cebra, *Xenopus*, gallinas, ratones y humanos (Figura 23.18).

En resumen, los genes que controlan el desarrollo en *Drosophila* actúan en cascada, ordenada temporal y espacialmente, comenzando con los genes que establecen el eje antero-posterior (y dorso-ventral) del huevo y del embrión temprano. Los gradientes de mRNA y proteínas maternas a lo largo del eje antero-posterior activan los genes gap, que subdividen al embrión en bandas anchas. Los genes gap a su vez activan a los genes de la regla par, que dividen al embrión en segmentos. El grupo final de genes de segmentación, los genes de la polaridad de los segmentos, divide cada segmento en regiones anterior y posterior dispuestas linealmente a lo largo del eje antero-posterior. Luego, los genes *Hox* dan identidad a los segmentos. Por consiguiente, esta restricción progresiva del potencial de desarrollo de las células embrionarias de *Drosophila* (todo ello se produce durante el primer tercio de la embriogénesis), implica una cascada de acción génica, con proteínas reguladoras actuando a los niveles transcripcional y traduccional.

Genes *Hox* y trastornos genéticos humanos

Aunque se describieron primero en *Drosophila*, los genes *Hox* se encuentran en el genoma de todos los animales pluricelulares, en donde juegan un papel fundamental en dar forma al cuerpo y a sus apéndices. Los humanos y la mayoría de los vertebrados tienen cuatro grupos de genes *Hox* (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* y *HOXD*) con 39 genes. La conservación de la secuencia, el orden de los genes en los grupos *Hox* y su patrón de expresión en los vertebrados sugieren que estos grupos de genes funcionan en moscas y humanos controlando el patrón de las estructuras a lo largo del eje antero-posterior (Figura 23.19). Las pruebas de esto vienen de estudios mutacionales en gallinas y ratones que demuestran que los genes *HOXD*, cercanos al extremo 5′ del grupo, juegan un papel básico en el desarrollo de las extremidades. Además, este papel de los genes *HOXD* en

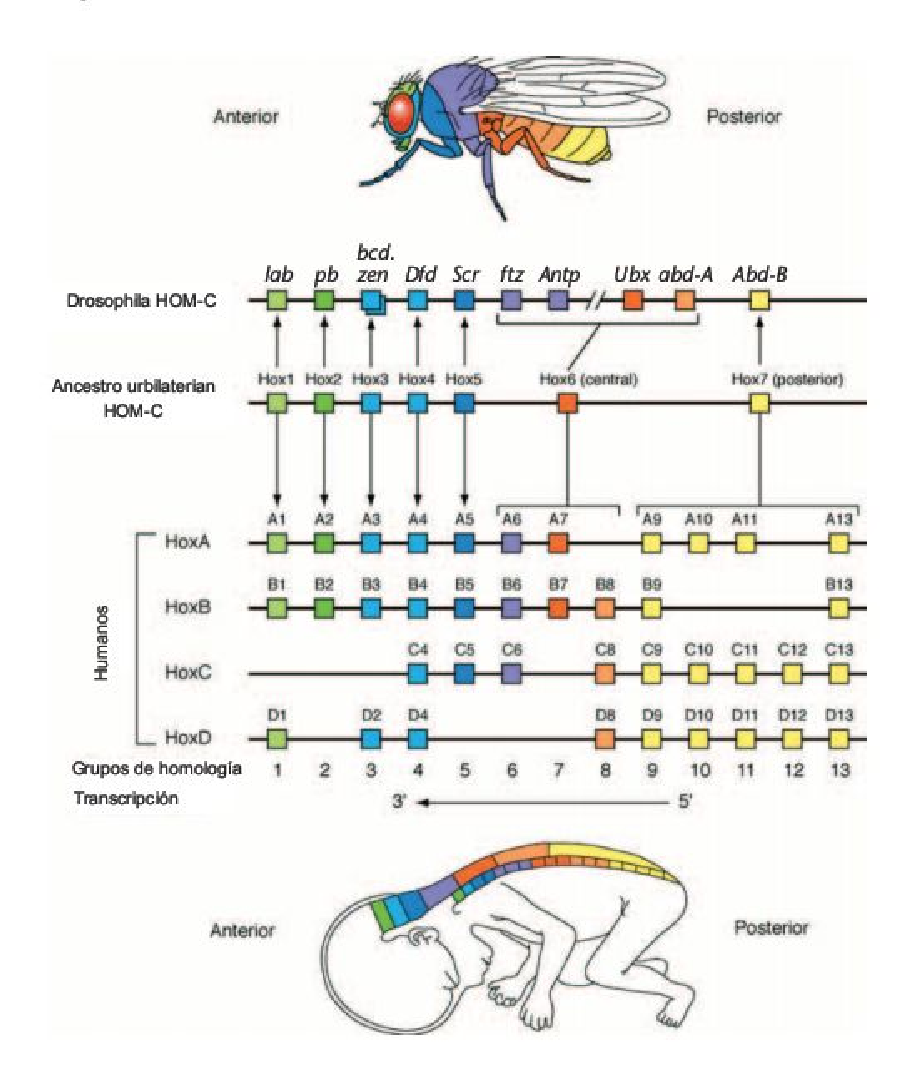


FIGURA 23.18 Conservación de la organización y de los patrones de expresión de los genes *Hox*. (Arriba) Se muestran las estructuras formadas en el adulto de *Drosophila*, con los colores que corresponden a los miembros de la agrupación *Hox* que controla su formación. (En medio) La reconstrucción de la agrupación *Hox* del antecesor común a todos los organismos bilaterales tiene siete genes. (Abajo) La disposición y patrones de expresión de las cuatro agrupaciones de genes *Hox* en un embrión temprano humano. Advierta que algunos genes posteriores se expresan en las extremidades. El patrón de expresión se deduce del que se observa en ratones. Como en *Drosophila*, los genes del extremo izquierdo de la agrupación forman estructuras anteriores y los del extremo derecho forman estructuras posteriores. Debido a las duplicaciones, los genes con igual homología a la secuencia ancestral se indican en corchetes.

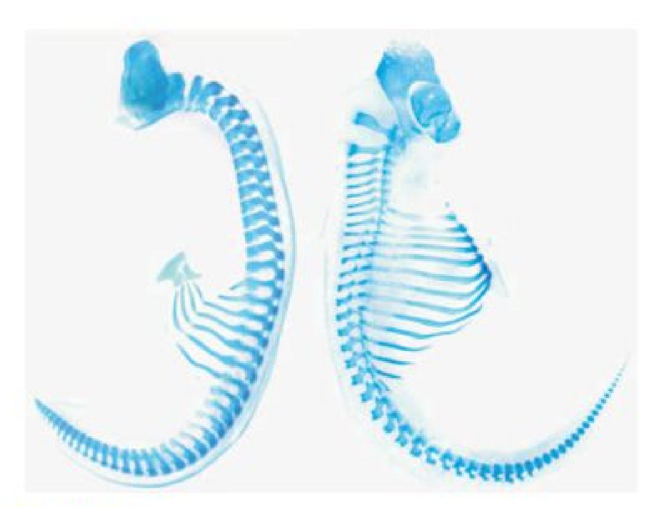


FIGURA 23.19 Patrones de expresión de los genes *Hox* que controlan la formación de las estructuras a lo largo del eje antero-posterior de animales con simetría bilateral de una manera específica de especie. En gallinas (izquierda) y en ratones (derecha) la expresión del mismo grupo de genes *Hox* está programada diferencialmente en el tiempo y en el espacio para dar lugar a formas corporales distintas.

humanos se confirmó por el descubrimiento de que cierto número de malformaciones hereditarias de las extremidades están ocasionadas por mutaciones específicas en los genes *HOXD*. Por ejemplo, la mutación *HOXD13* da lugar a la simpolidactilia (SPD), una malformación que se caracteriza por dedos extra y anormalidades en los huesos de manos y pies (Figura 23.20).

Control de la expresión génica de *Hox*

En *Drosophila* se han identificado cierto número de genes que controlan la expresión de los genes Hox, como *extra sex combs* (*esc*), *Polycomb* (*Pc*) *supersex combs* (*sxc*) y *trithorax* (*trx*). En el mutante *extra sex combs* (*esc*), algo de la cabeza y todos los segmentos torácicos y abdominales se desarrollan como segmentos posteriores (Figura 23.21), lo que indica que este gen normalmente controla la expresión de los genes *BX-C* en todos los segmentos corporales. La mutación no afecta ni al número ni a la polaridad de los segmentos. Afecta a su destino de desarrollo, indicando que el producto del gen esc^+ almacenado en el óvulo por el genoma materno puede necesitarse para interpretar correctamente el gradiente de información en el córtex del huevo.

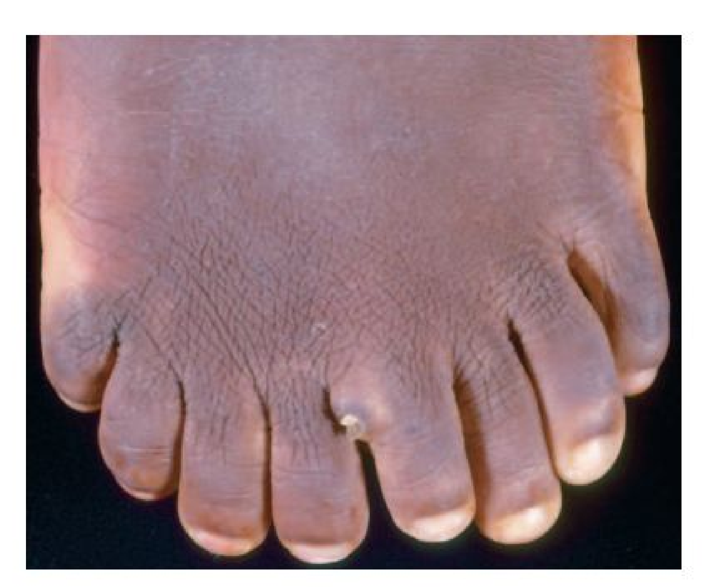


FIGURA 23.20 Mutaciones en los genes posteriores *Hox* (en este caso en el *HoxD13*) en la especie humana dan lugar a malformaciones en las extremidades, mostrándose aquí dedos extra en el pie. Este fenotipo se conoce como simpolidactilia. Las mutaciones en el *HoxD13* también están asociadas con anormalidades en los huesos de las manos y de los pies.

Las proteínas codificadas por los miembros de la familia *Polycomb* controlan la expresión de los genes *Hox* alterando la conformación de la cromatina, bloqueando la unión de los factores de transcripción. Estas proteínas se unen en el lugar de un gen y forman complejos multiproteicos que modifican la cromatina y promueven el silenciamiento del gen. Las proteínas *trithorax* invierten la inactivación de los genes basada en la cromatina. Estas proteínas actúan como activadores transcripcionales e invierten los bloqueos que ocasionan proteínas inactivadoras, como los productos codificados por *Polycomb*.

Poco se conoce en otros organismos, incluida la especie humana, de genes distintos de los identificados en *Drosophila* que ejerzan el control sobre los genes *Hox*. Los resultados hasta la fecha indican que los circuitos reguladores que operan corriente arriba de los genes *Hox* no están ampliamente conservados en los sistemas animales. Si esto es así, el estudio de los organismos modelo puede no ser útil para la comprensión de cómo son regulados los genes *Hox* en humanos.

Ahora resuelva esto

El Problema 23.17 de la página 700 se refiere al análisis de la expresión génica en embriones con fondos genéticos distintos.

Sugerencia: Es el fondo genético el que proporciona las claves para el momento de la expresión y de los patrones reguladores de los dos genes en cuestión.

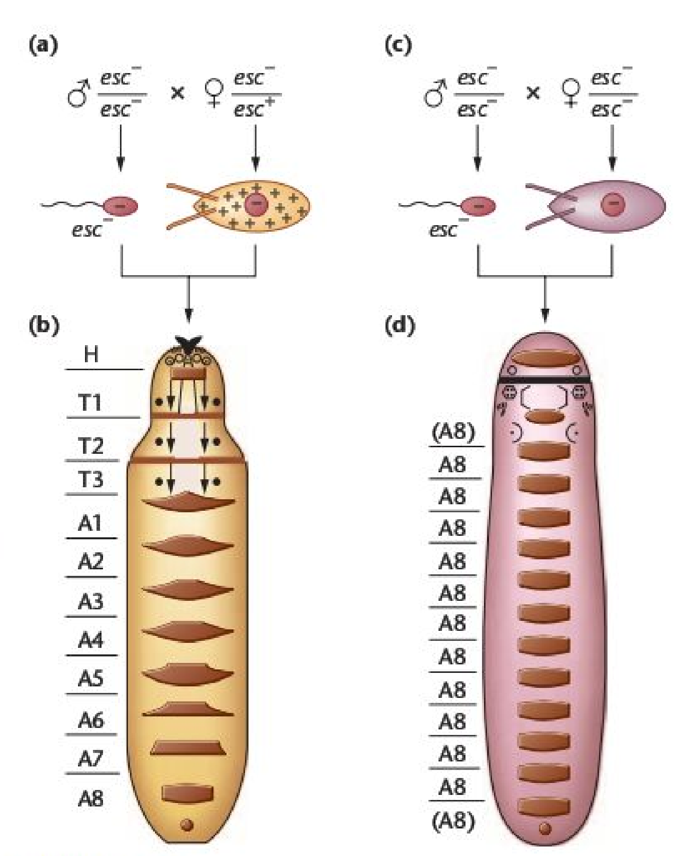


FIGURA 23.21 Acción de la mutación *extra sex combs (esc)* en *Drosophila*. (a) Las hembras heterozigotas forman el producto de gen *esc* de tipo silvestre y lo almacenan en el oocito. (b) Cuando un óvulo *esc*⁻, producido en la meiosis por las hembras heterozigotas, es fecundado por esperma *esc*⁻, se produce una larva de tipo silvestre con un patrón de segmentación normal (rescate materno). Los límites entre la cabeza y el tórax y entre el tórax y el abdomen están marcados con flechas. (c) Las hembras homozigotas *esc*⁻ forman huevos defectuosos, los cuales, cuando son fecundados por esperma *esc*⁻, (d) dan lugar a larvas en las que la mayoría de los segmentos de la cabeza, del tórax y del abdomen se han transformado en el octavo segmento abdominal. El rescate materno demuestra que el producto del gen *esc* lo produce el genoma materno y se almacena en el oocito para su utilización en el embrión. (H, cabeza; T1-T3, segmentos torácicos, A1-A8 segmentos abdominales.)

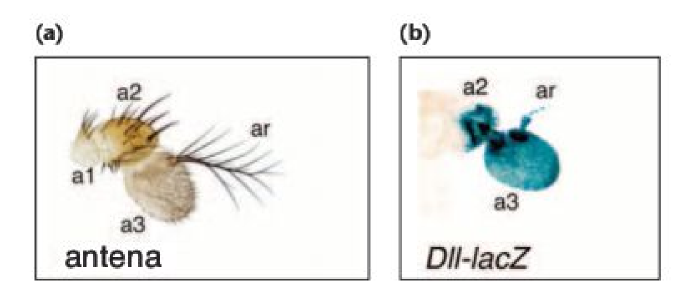
23.7 Cascadas de acción génica controlan la diferenciación

Además de los genes homeóticos, en la agrupación de genes *Hox* hay una variada y gran familia de otros genes homeóticos en los genomas de eucariotas. En *Drosophila*, uno de estos, *Distal-less* (*Dll*), juega un papel importante en el desarrollo de los apéndices, como las antenas, piezas bucales, patas y alas. Este gen, del cromosoma 2, que codifica un factor de transcripción homeótico, es el primer gen que se supo se expresaba en la for-

mación de los apéndices. Las mutaciones en el *Dll* dan lugar a una gran variedad de fenotipos, como la transformación de las antenas en patas y la formación de patas más cortas que han perdido las estructuras distales.

En la antena, la expresión del alelo silvestre *Dll* tiene dos papeles: dirige a las células para formar una antena en lugar de una pata y controla la especificación proximal (mas próxima al cuerpo) y distal (mas lejos del cuerpo) de las estructuras de las antenas.

Las antenas son las orejas y las narices de la mosca y tienen varios componentes, como la arista y tres segmentos de la antena [Figura 23.22(a) y (b)]. La arista vibra en respuesta a ondas sonoras; estas vibraciones inician señales que se transfieren, a través del segundo segmento de la antena, al primer segmento y, a través del nervio de la antena, al cerebro. El tercer segmento de la antena está cubierto de receptores olfativos. Estos son estimulados por olores que generan señales que se transfieren al cerebro a través de los dos primeros segmentos de la antena y a un nervio conectado con el cerebro.



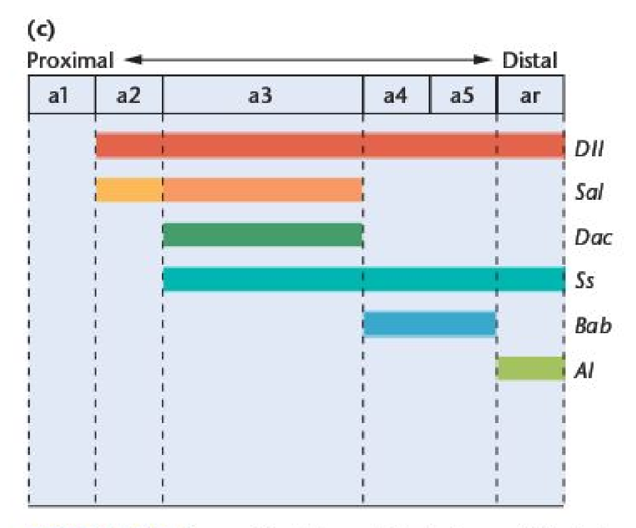


FIGURA 23.22 La acción del gen *Dll* de *Drosophila* da lugar a (a) la antena normal, formada por la arista (ar) y tres segmentos (a1, a2, a3) de la antena. (b) Expresión de *Dll* (mostrada en azul) en una antena pupal tardía. La expresión en este estadio está limitada a la arista y a3. (c) Activación de los genes diana de *Dll* en los segmentos de la antena durante el tercer estadio larvario, exactamente antes del estado de pupa. En dicho estadio, *Dll* se expresa en todos los segmentos excepto en a1. Cada uno de estos genes diana es un factor de transcripción, que a su vez activa una cascada de otros genes.

La expresión de *Dll* al principio del estadio pupal [Figura 23.22(b)] está restringida al segundo y tercer segmento de la antena y a la arista y es el primer paso de una cascada de expresión génica asociada con diferenciación. En la transformación de larva a pupa, *Dll* activa a cinco genes y cada uno se expresa en un patrón específico de segmento [Figura 23.22(c)]. Cuatro de estos genes(*spalt, spineless, bric a brac* y *aristaless*) codifican factores de transcripción. Cada uno de estos genes controla a su vez múltiples genes diana. El quinto gen, *dachshund*, codifica una proteína de función desconocida que está confinada en el núcleo. Los genes activados por la expresión de *Dll* inician una cascada de expresión génica específica de segmento que da lugar a la diferenciación de la antena y de la arista, pero los detalles de cómo se realiza esto todavía están en estudio.

En la especie humana hay seis genes (*Dlx1-Dlx6*) de la familia génica *Distal-less,* con una secuencia homeótica íntimamente relacionada con el gen de *Drosophila Dll.* El gen de *Drosophila Dll* se expresa en la cabeza y en los apéndices en desarrollo y las mutaciones de este gen son responsables de un trastorno hereditario denominado síndrome tricodento-óseo (TDO). Este trastorno, dominante autosómico, da lugar a deficiencias en la calcificación de los huesos del cráneo y defectos en el esmalte de los dientes.

El descubrimiento de que el TDO está ocasionado por una mutación en un gen homeótico, comenzó con el análisis mutacional del desarrollo de *Drosophila* e ilustra el importante papel que juegan los organismos modelo para entender los trastornos genéticos humanos. Los genes humanos *Distal-less* se descubrieron en 1994 analizando una librería de cDNA humano con una sonda clonada que tenía la secuencia homeobox del gen *Dll* de *Drosophila* y el gen *Dlx3* se cartografió en el cromosoma 17 en 1995 utilizando la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El TDO se describió en 1966, pero la naturaleza del gen y su localización era desconocida. En 1997 los genéticos encontraron que el TDO estaba ligado a marcadores en el cromosoma 17. Trabajos posteriores situaron al TDO en el mismo locus que *Dlx3* y en 1998 el análisis de mutaciones en individuos afectados confirmó que el TDO está ocasionado por una deleción de 4 pb en el *Dxl3*.

23.8 Las plantas han evolucionado sistemas que son paralelos a los genes *Hox* de los animales

El desarrollo de las flores en *Arabidopsis thaliana* (Figura 23.23), una pequeña planta de la familia de la mostaza, se ha utilizado para estudiar los patrones de formación en plantas. Un grupo de células no diferenciadas, el llamado *meristema floral*, da lugar a las flores (Figura 23.24). Cada flor consta de cuatro órganos —sépalos, pétalos, estambres y carpelos— que se desarrollan a partir de anillos concéntricos de células del meristema [Figura 23.25(a)]. Cada órgano se desarrolla de un verticilo diferente.



FIGURA 23.23 La fanerógama *Arabidopsis thaliana*, utilizada como organismo modelo en genética vegetal.

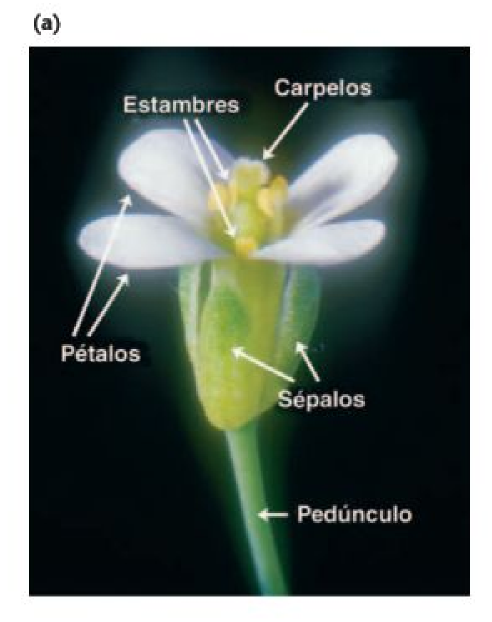




FIGURA 23.24 (a) Partes de la flor de *Arabidopsis*. Los órganos florales se disponen concéntricamente. Los sépalos forman el anillo más externo, seguido por los pétalos y los estambres con carpelos en el interior. (b) Vista de la flor desde arriba.

Genes homeóticos en *Arabidopsis*

Tres clases de genes homeóticos florales controlan el desarrollo de estos órganos: los genes de la clase A especifican los sépalos, los de las clases A y B los pétalos, los de las clases B y C controlan la formación de los estambres. Los genes de la clase C especifican los carpelos [Figura 23.25(b)]. En la Tabla 23.4 se enumeran los genes de cada clase. Los genes de la clase A son activos en los dos verticilos más externos (sépalos y pétalos), los genes de la clase B se expresan en el segundo y tercer verticilo (pétalos y estambres) y los genes de la clase C actúan en el tercero y cuarto verticilo (estambres y carpelos). Los órganos formados dependen de los patrones de expresión de las tres clases de genes. Si se expresan sólo los genes de la clase A se forman sépalos. Si se expresan los genes de las clases A *y* B se forman pétalos. La actividad de los genes de las clases B *y* C da lugar a la formación de estambres. Si sólo se expresan los genes de la clase C se forman carpelos.

Como en *Drosophila*, las mutaciones en los genes homeóticos dan lugar a órganos que se forman en localizaciones anor-

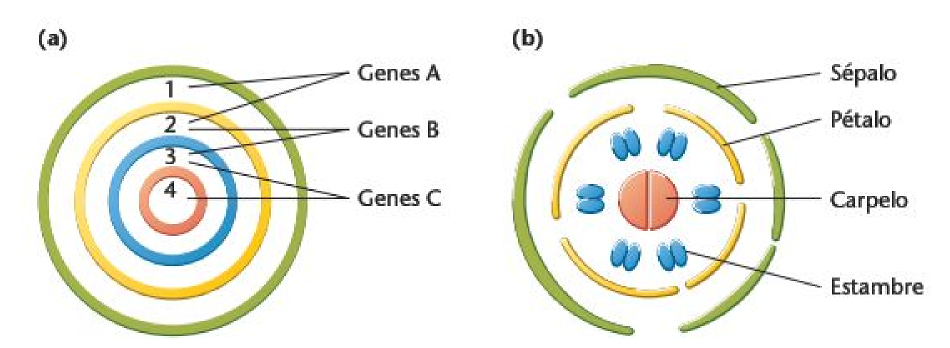


FIGURA 23.25 Disposición de las células en el meristemo floral. (a) los cuatro anillos concéntricos, o verticilos, numerados del 1 al 4, dan lugar a (b) Disposición de los sépalos, pétalos, estambres y carpelos en la flor madura.

TABLA 23.4 **GENES SELECTORES HOMEÓTICOS DE *ARABIDOPSIS***

Clase A	*APETALA1 (AP1)**
	APETALA2 (AP2)
Clase B	*APETALA3 (AP3)*
	PISTILLATA (P1)
Clase C	*AGAMOUS (AG)*

* Por convención, los genes de tipo silvestre de *Arabidopsis* se escriben en mayúsculas.

males. Por ejemplo, en los mutantes *AP2* (que carecen de actividad de un gen de la clase A), el orden de los órganos es carpelos, estambres, estambres y carpelos, en lugar del orden normal, sépalos, pétalos, estambres y carpelos [Figura 23.26(a) y (b)]. Si se elimina por mutación la actividad de las clases de genes A y B, entonces todos los verticilos tendrán activos solo los genes de la clase C (que se extenderá al primero y segundo verticilo debido a la ausencia de la clase A), y el orden de los órganos será sépalo, pétalo, pétalo y sépalo [Figura 23.26(d)].

Divergencia evolutiva de los genes homeóticos

Las vegetales y los animales divergieron de un antecesor común hace unos 1.600 millones de años, después del origen de los eucariotas y probablemente antes de la aparición de los organismos pluricelulares. Del análisis genético del desarrollo tanto en *Drosophila* como en *Arabidopsis*, está claro que cada organismo utiliza un grupo de genes reguladores maestros para establecer el eje corporal y para especificar las estructuras a lo largo del eje. En *Drosophila* esta tarea la llevan a cabo en parte los genes *Hox*, que codifican un grupo de factores de transcripción que comparten un dominio homeótico. Sin embargo, en *Arabidopsis*, los genes homeóticos florales son miembros de una familia distinta de factores de transcripción, llamada las proteínas de la caja MADS. Cada miembro de esta familia tiene una secuencia común de 58 aminoácidos, sin semejanza con la secuencia de aminoácidos o con la estructura proteica de los genes *Hox*. Ambos grupos de genes codifican factores de transcripción, ambos grupos son reguladores maestros del desarrollo que se expresan en un patrón de dominios solapados y ambos especifican la identidad de las estructuras.

Reflejando sus orígenes evolutivos comunes, los genomas de ambos organismos tienen miembros de los genes de la caja homeótica y de la caja MADS, pero estos genes se han adoptado a usos distintos en los reinos vegetal y animal, indicando que los mecanismos de desarrollo evolucionaron independientemente en cada grupo.

Tanto en vegetales como en animales, la acción de los factores de transcripción depende de cambios en la estructura de la cromatina que hace que los genes se puedan expresar. Los mecanismos de iniciación de la transcripción se conservan en vegetales y animales y esto se refleja en la homología de los genes de *Drosophila* y *Arabidopsis* que mantienen patrones de expresión iniciados por grupos de genes reguladores. La acción de los genes homeóticos florales está controlada por un gen llamado *CURLY LEAF*. Este gen comparte una homología significativa con miembros de la familia génica *Polycomb* de *Drosophila*, un grupo de genes que regula los genes de la caja homeótica en el desarrollo de la mosca de la fruta. Ambos genes codifican proteínas que alteran la conformación de la cromatina e interceptan la expresión génica. Así, aunque se usan genes distintos para controlar el desarrollo, tanto los animales como los vegetales utilizan un mecanismo conservado evolutivamente para regular la expresión de estos grupos de genes.

23.9 Interacciones entre células en el desarrollo de *C. elegans*

En el desarrollo de los organismos pluricelulares, las interacciones entre células influyen en los patrones de transcripción



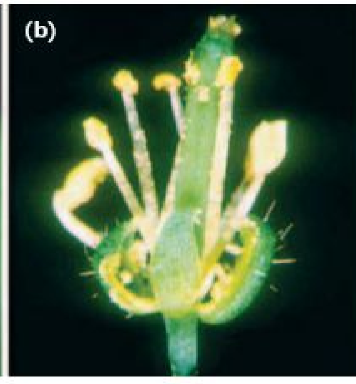






FIGURA 23.26 (a) Las flores silvestres de *Arabidopsis* tienen (desde fuera hacia dentro) sépalos, pétalos, estambres y carpelos. (b) Mutación floral homeótica *APETALA2*, con carpelos, estambres, estambres y carpelos. (c) Los mutantes *PISTILLATA* tienen sépalos, sépalos, carpelos y carpelos. (d) Los mutantes *AGAMOUS* tiene pétalos y sépalos en los lugares en donde se hubieran formado estambres y carpelos.

y en el destino del desarrollo de las células vecinas. Esta interacción célula-célula es un proceso importante en el desarrollo embrionario de la mayoría de los organismos eucariotas, como en *Drosophila* y en vertebrados, como *Xenopus*, el ratón y la especie humana

Sistemas de señalización en el desarrollo

En el desarrollo temprano, los vertebrados utilizan cinco sistemas de señalización: después de iniciarse la organogénesis se añaden otros cinco sistemas de señalización a los ya utilizados. Estos sistemas actúan independientemente y en redes coordinadas para enviar y recibir señales en el desarrollo que inducen respuestas transcripcionales específicas. Las redes de señales establecen la polaridad antero-posterior y los ejes corporales, coordinan la formación de patrones y dirigen la diferenciación de los tejidos y órganos. En la Tabla 23.5 se enumeran las rutas de señalización utilizadas en el desarrollo temprano y algunos de los procesos de desarrollo que controlan. Después de una introducción de los componentes y de las interacciones de uno de estos sistemas —la ruta de señalización Notch— examinaremos brevemente su papel en el desarrollo de la vulva del nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

TABLA 23.5 **SISTEMAS DE SEÑALIZACIÓN UTILIZADOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO**

Ruta Wnt
- Dorsalización del cuerpo
- Desarrollo reproductivo de la hembra
- Diferencias dorso-ventrales

Ruta TGF-β
- Inducción del mesodermo
- Asimetría izquierda-derecha
- Desarrollo óseo

Ruta Hedgehog
- Inducción de la notocorda
- Somitogénesis
- Mesodermo intestino/vísceras

Ruta del receptor de la tirosina quinasa
- Mantenimiento del mesodermo

Ruta Notch/Delta
- Desarrollo de las células sanguíneas
- Neurogénesis
- Desarrollo de la retina

Tomado de Gerhart, J. 1999. Lectura Warkany 1998: Signaling pathways in development. *Teratology* 60:226-39.

La ruta de señalización Notch

Los genes de la ruta Notch reciben el nombre de los mutantes de *Drosophila* en donde se descubrió parte de la ruta. Notch es un sistema de señalización de pequeño rango, que actúa mediante el contacto directo entre células, para controlar el destino de desarrollo de las células que interactúan. El gen *Notch* (y el gen equivalente en otros organismos) codifica un receptor de señal transmembrana (Figura 23.27). La señal es otra proteína transmembrana codificada por el gen *Delta* (y sus equivalentes). Debido a que tanto la señal como el receptor se unen a la membrana, el sistema de señales Notch actúa sólo entre células adyacentes. Cuando la proteína Delta se une a un receptor Notch, la extremidad citoplásmica de la proteína Notch se separa y se une a una proteína citoplásmica codificada por el gen *Su(H)*(supresor de Hairy). Este complejo proteico se desplaza hacia el núcleo y se une a cofactores de transcripción que activan la transcripción de un conjunto de genes que controlan una ruta de desarrolla específica (Figura 23.27).

Las variaciones de esta ruta controlan cierto número de procesos de desarrollo distintos en *Drosophila*, estableciendo los límites dorso-ventral en los discos del ala y dirigiendo el destino de las células de los sistemas nervioso, muscular y digestivo. Uno de los papeles principales del sistema de señales Notch es especificar el destino de células equivalentes de una población. En su forma más simple, esta interacción implica a dos células vecinas que son equivalentes en el desarrollo. En la especie humana se han identificado cuatro miembros de la familia Notch (*NOTCH1-NOTCH4*). Las mutaciones en dichos genes y en otros genes de la ruta Notch son responsables de una serie de trastornos del desarrollo en la especie humana,

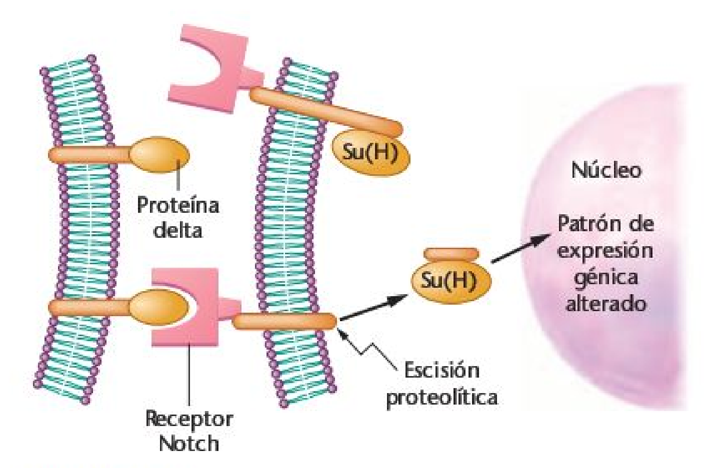
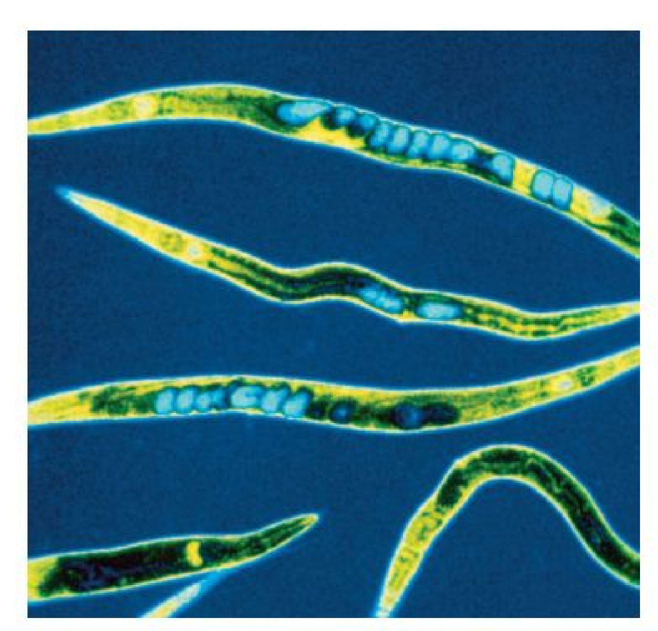


FIGURA 23.27 Componentes del sistema de señalización Notch. La célula que lleva la proteína transmembrana Delta es la que envía la señal; la célula que lleva la proteína transmembrana Notch es la que recibe la señal. La unión de Delta a Notch dispara la activación de la transcripción de un mediador proteolítico. El fragmento escindido de la proteína Notch del lado del citoplasma se combina con la proteína Su(H) y se desplaza al núcleo en donde activa un programa de transcripción génica.

como el síndrome de Alagille (AGS) y la disostosis espóndilocostal (SD). Exploraremos el papel del sistema de señalización Notch en el desarrollo de la vulva de *C. elegans*, después de una breve introducción de la embriogénesis del nemátodo.

Generalidades del desarrollo de *C. elegans*

El nematodo *C. elegans* es muy utilizado para estudiar el control genético del desarrollo. Este organismo tiene varias ventajas para tales estudios: (1) se conoce bien la genética del organismo, (2) se dispone de la secuencia de su genoma y (3) los adultos están formados por un pequeño número de células que siguen un programa de desarrollo que no cambia de un individuo a otro. Los nematodos adultos tienen aproximadamente 1 mm de longitud y tardan unos dos días en madurar a partir de un óvulo fecundado (Figura 23.28). Su ciclo biológico consiste en un estadio embrionario (unas 16 horas), cuatro estadios larvarios (de L1 a L4) y el estadio adulto. Los adultos tienen dos sexos: hermafroditas XX, que pueden producir tanto óvulos como esperma, y machos X0. La autofecundación de hermafroditas tratados con mutágenos produce rápidamente cepas de mutantes homozigotos, habiéndose generado, catalogado y cartografiado cientos de mutantes.



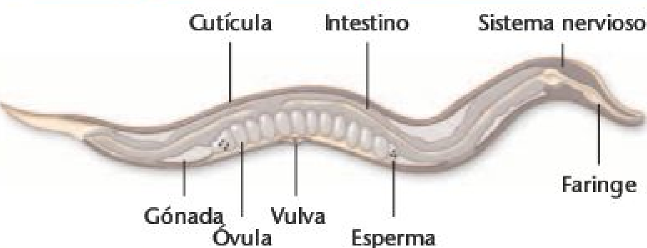


FIGURA 23.28 *Caenorhabditis elegans* adulto. Este nematodo, de aproximadamente 1 mm de longitud, está formado por 959 células y se ha utilizado para estudiar muchos aspectos del control genético del desarrollo.

El hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas (y unas 2.000 células germinales). Se ha cartografiado el linaje celular exacto desde el óvulo fecundado hasta el adulto (Figura 23.29), siendo invariante entre individuos. Conociendo el linaje de cada célula, es fácil seguir los sucesos que resultan de mutaciones que alteran los destinos celulares o de la eliminación de células utilizando delgados rayos láser o radiación ultravioleta. En hermafroditas de *C. elegans*, el destino de las células durante el desarrollo del sistema reproductor se determina mediante interacciones célula-célula y proporciona algunas ideas de cómo la expresión génica y las interacciones célula-célula trabajan juntas para especificar los resultados del desarrollo.

Ahora resuelva esto

En el Problema 23.28 de la página 702 se refiere a dos genes que controlan la determinación del sexo en *C. elegans*.

Sugerencia: Al resolver este problema recuerde considerar la acción de los productos génicos y el efecto de las mutaciones de pérdida de función sobre la expresión de otros genes o la acción de otras proteínas.

Análisis genético de la formación de la vulva

Los hermafroditas adultos de *C. elegans* depositan huevos por la vulva, una abertura localizada aproximadamente en el centro del cuerpo (Figura 23.28). La vulva se forma en estadios del desarrollo larvario e implica varios ciclos de interacciones célula-célula.

Durante el desarrollo de *C. elegans*, dos células vecinas equivalentes en el desarrollo, Z1.ppp y Z4.aaa, interaccionan entre sí, de tal manera que una se convierte en la célula de anclaje gonadal y la otra se convierte en un precursor uterino ventral. La determinación de cual se convierte en una u otra se produce durante el segundo estadio larvario (L2), y está controlada por el gen receptor Notch *lin-12*. En mutantes recesivos *lin-12(0)* (un mutante de pérdida de función), ambas células se convierten en células de anclaje. El mutante dominante *lin-12*(d) (mutación de ganancia de función) hace que las dos se conviertan en precursores uterinos. Así, parece que la expresión del gen *lin-12* provoca la selección de la ruta uterina, puesto que en ausencia del receptor LIN-12 (Notch), ambas se convierten en células de anclaje.

Sin embargo, como se muestra en la Figura 23.30, la situación es más compleja de lo que parece a primera vista. Inicialmente, las células vecinas son equivalentes en cuanto al desarrollo. Cada célula presenta bajos niveles de la señal Notch (codificada por el gen *lag-2*) y bajos niveles del receptor Notch. Esta situación es inestable y ambas células no pueden continuar mandando y recibiendo señales de desarrollo. Por azar, la célula que segrega más de la señal LAG-2 (Delta) da lugar a que la célula vecina aumente la producción del receptor LIN-12. Por

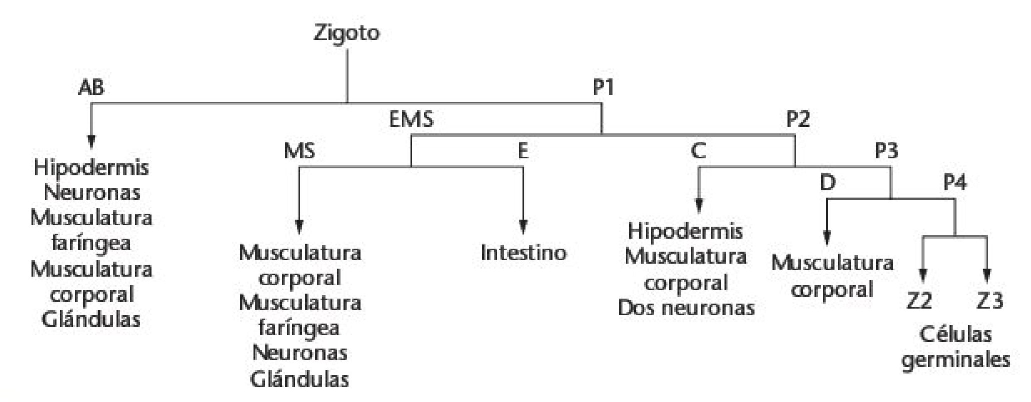
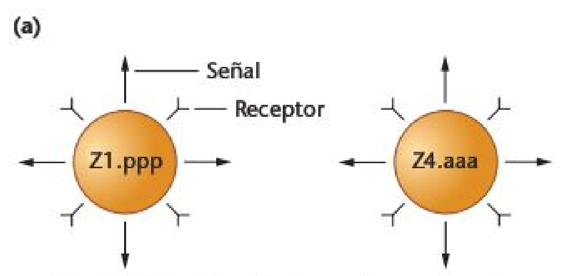


FIGURA 23.29 Esquema de un linaje celular ramificado de *C. elegans*, que muestra las primeras divisiones, los tejidos y los órganos. Cada línea vertical representa una división celular y las líneas horizontales conectan las dos células que se han producido. Por ejemplo, la primera división celular da lugar a dos nuevas células, AB y P1, a partir del zigoto. Las células que se muestran se refieren a las que se encuentran en el primer estadio larvario, L1. En los estadios larvarios posteriores, sucesivas divisiones celulares producirán las 959 células somáticas del nematodo hermafrodita adulto.



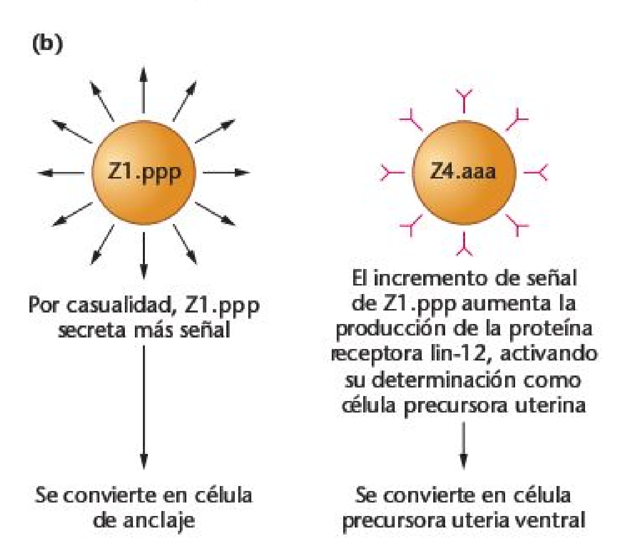


FIGURA 23.30 Interacción célula-célula en la determinación de la célula de anclaje. (a) Durante L2, dos células vecinas comienzan a secretar señales químicas para inducir la diferenciación del útero. (b) Por azar, la célula Z1.ppp secreta más señal, dando lugar a que la célula Z4.aaa aumente la producción del receptor de señales. La acción de este incremento de señal hace que Z4.aaa se convierta en la célula precursora uterina ventral y permite que Z1.ppp se convierta en la célula de anclaje.

ello, la célula que produce más receptor se convierte en la célula precursora uterina ventral, y la otra célula, con más señal, se convierte en la célula de anclaje. El factor esencial en esta primera ronda de interacción célula-célula es el equilibrio entre el producto del gen LAG-2 (Delta) y el producto del gen LIN-12 (Notch).

Una segunda ronda de interacciones célula-célula en el desarrollo larvario implica a la célula de anclaje (localizada en la gónada) y a seis células precursoras (localizadas en la piel, o hipodermis) adyacente a la gónada. Las células precursoras se denominan de P3.p a P8.p, y en conjunto se denominan células Pn.p. El destino de cada célula Pn.p está especificado por su posición relativa respecto de la célula de anclaje. En la Figura 23.31 se muestran las rutas de desarrollo descritas en los siguientes párrafos.

A veces, en larvas de tercer estadio, el gen *lin-3* se expresa en la célula de anclaje. El producto génico LIN-3 es una señal proteica relacionada con el factor de crecimiento epidérmico de los vertebrados (EGF). Las seis células Pn.p expresan un receptor codificado por el *let-23*, un gen homólogo del receptor de los vertebrados EGF. La unión de LIN-3 al receptor LIN-23 inicia una cascada intracelular que determina si las células precursoras formarán las células precursoras primarias o las células secundarias de la vulva. En otras palabras, *let-23* establece los destinos primario o secundario de las células precursoras. Las mutaciones recesivas de pérdida de función del gen *let-23* dan lugar a que las células Pn.p actúen como si no hubieran recibido ninguna señal, y por ello no se forma la vulva.

Las señales transmitidas desde las células de anclaje a las células Pn.p también implican al gen *let-60*. Mutaciones recesivas en el *let-60* dan lugar a que las células precursoras se desarrollen como si no hubieran recibido una señal de la célula de anclaje. Los alelos dominantes de *let-60* tienen el fenotipo contrario, dando lugar a que todas las células precursoras respondan, formando así múltiples vulvas. El gen *let-60* de *C. elegans* es homólogo del gen *ras*, un protooncogen humano. El mutante

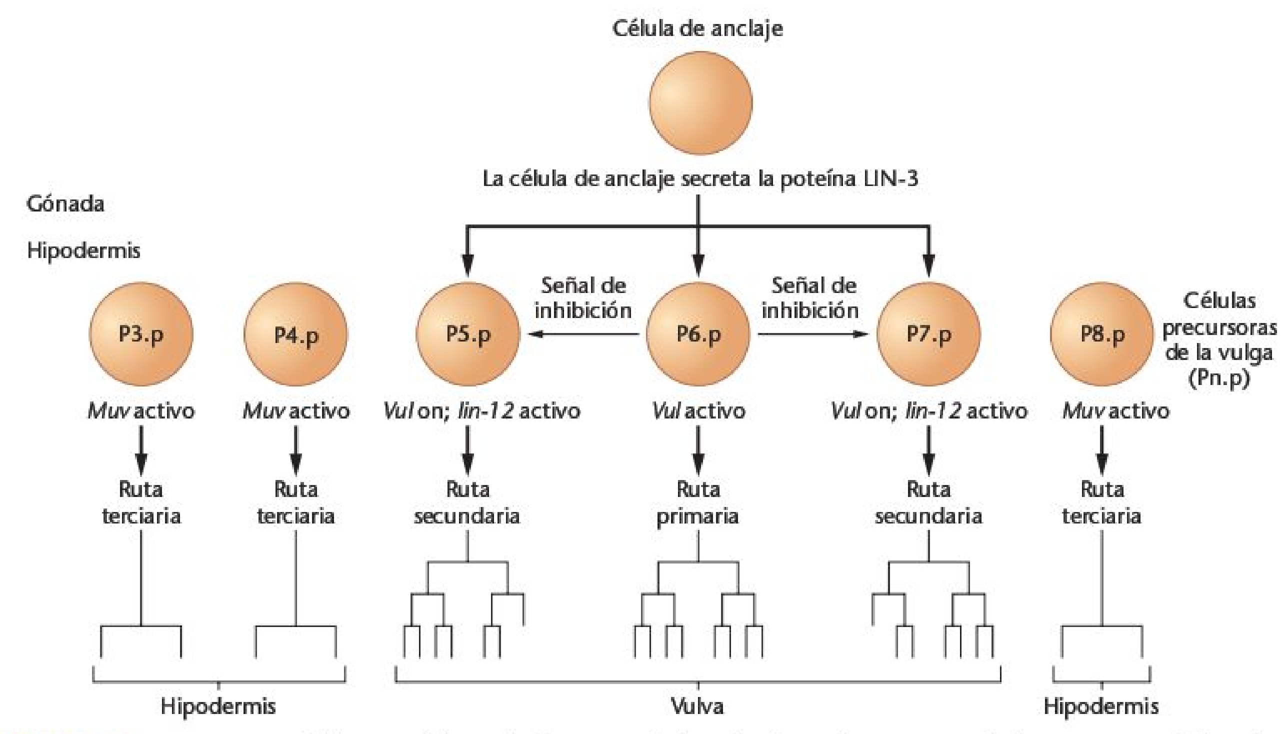


FIGURA 23.31 Determinación del linaje celular en la formación de la vulva de *C. elegans*. Tres células precursoras de la vulva (células Pn.p) reciben una señal de la célula de anclaje en forma de proteína LIN-3. Las células más cercanas a la célula de anclaje se convierten en células precursoras primarias de la vulva, y las células adyacentes se convierten en células precursoras secundarias. Las células primarias secretan una señal que activa el gen *lin*-12 en las células secundarias, evitando que éstas se conviertan en células primarias. En las células precursoras flanqueantes, que no reciben ninguna señal de la célula de anclaje, aumenta la actividad del gen *Muv*, y se convierten en hipodermis, en lugar de en células de la vulva.

dominante de ganancia de función *let-60*, que da lugar a la formación de múltiples vulvas, tiene una mutación Gly-Glu en el aminoácido 13, la misma mutación que convierte al gen *c-ras* en oncogen.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos si el sistema de señalización en el desarrollo de la vulva actúa sólo sobre las células adyacentes o utiliza señales que pueden afectar a células más distantes?

Normalmente, la célula más cercana a la célula de anclaje (P6.p) es la que recibe la señal más fuerte, iniciada por la unión de LIN-3 a LIN-23. Esta señal activa la expresión del gen *Vulvaless* (*Vul*) (que recibe este nombre por su fenotipo mutante) en P6.p y la célula adopta la ruta primaria de diferenciación - se divide tres veces para producir células de la vulva. Las dos células vecinas (P5.p y P7.p) reciben una cantidad menor de señal, e inician un destino secundario. Estas células se dividen asimétricamente para formar más células de la vulva.

Para reforzar estas rutas de desarrollo, se utiliza un tercer nivel de interacción célula-célula. La célula P6.p activa al gen *lin-12* en las dos células vecinas (P5.p y P7.p). Esta señal evita que P5.p y P7.p adopten el patrón de división de la célula primaria. Dicho de otra manera, las células en donde tanto *Vul* como *lin-12* están activos no pueden convertirse en células primarias de la vulva. Las tres células precursoras restantes (P3.p, P4.p y P8.p) no reciben ninguna señal de la célula de anclaje. En estas células se expresa el gen *Multivulva* (*Muv*), *Muv* reprime a *Vul*, y estas tres células se desarrollan como células de la epidérmicas.

Así, se utilizan tres niveles de interacción célula-célula en la ruta de desarrollo que conduce a la formación de la vulva en *C. elegans*. Primero, dos células vecinas interaccionan para establecer la identidad de la célula de anclaje. Segundo, la célula de anclaje interacciona con tres células precursoras de la vulva para establecer la identidad de la célula primaria precursora de la vulva (normalmente P6.p) y de dos células secundarias (P5.p y P7.p). Tercero, la célula primaria de la vulva interacciona con las células secundarias para suprimir su posibilidad de adoptar la ruta de la célula primaria de la vulva. Cada una de estas interacciones está acompañada por la secreción de señales moleculares y por la recepción y el procesado de estas señales en las células vecinas.

Este ejemplo de interacciones célula-célula actuando en una cascada espacial y temporal para especificar el destino de desarrollo de células individuales es un tema que se repite una

Seminario Web 23.1
Muerte celular programada

y otra vez durante el desarrollo de los organismos, desde procariotas hasta la especie humana.

En la especie humana, hay cuatro genes Notch que codifican receptores que juegan papeles importantes en generar células del sistema inmunitario y de las células madre de la médula ósea. Las mutaciones en la ruta de señalización Notch son responsables de varios trastornos hereditarios, como el síndrome de Alagille. Este trastorno dominante autosómico produce anormalidades del desarrollo en el hígado, corazón y sistema circulatorio y en el esqueleto.

23.10 Para un desarrollo normal se necesita la muerte celular programada

La muerte celular programada, o **apoptosis**, es un programa de desarrollo controlado genéticamente que configura y moldea los tejidos y los órganos. Un ejemplo muy bien conocido de muerte celular programada es la formación de dedos en las extremidades de los vertebrados. Este proceso requiere la muerte de células interdigitales (Figura 23.32). Los genes que controlan la apoptosis se identificaron por primera vez en *C. elegans*. En *C. elegans*, el desarrollo normal descansa en la muerte celular programada. El número de células que muere durante el desarrollo del nematodo es siempre el mismo, 131 de 1.090 en hermafroditas y 147 de 1.178 en machos. Además, el momento del desarrollo en el que una célula dada muere y la identidad de las células que mueren es siempre el mismo.

El análisis mutacional indica que, aunque ocurre muerte celular programada en células de linajes distintos, todas las células utilizan la misma ruta genética. En *C. elegans* hay 15 genes implicados en la muerte celular. Estos genes controlan cuatro procesos: (1) decisiones acerca de la muerte celular, (2) ejecución de las decisiones, (3) fagocitosis de las células muertas y (4) degradación de los restos de la célula dentro de las células que las fagocitan.

La expresión de *ced-3* y *ced-4* es necesaria para la ejecución del programa de muerte celular; las mutaciones que inactivan a cualquiera de estos dos genes da lugar a la supervivencia de las células que normalmente morirían. La expresión de *ced-3* y *ced-4* está controlada por *ced-9*. Las mutaciones de ganancia de función que dan lugar a expresión constitutiva o sobreexpresión de *ced-9* evitan la muerte celular. Al contrario, los mutantes de pérdida de función que inactiva *ced-9* dan lugar a letalidad embrionaria, indicando que *ced-9* actúa inactivando *ced-3* y *ced-4* en las células que sobreviven (Figura 23.32). En otras palabras, *ced-9* es un *gen conmutador binario* para la apoptosis. Las células que expresan *ced-9* sobreviven y aquellas que no, mueren.

El gen *ced-9* de *C. elegans* tiene un homólogo humano, el *bcl-2*, un protooncogen que controla la apoptosis. Las mutaciones que sobreexpresan a *bcl-2* evitan la muerte de las células que normalmente morirían. En humanos, la sobreexpresión de *bcl-2* se encuentra en el linfoma folicular, una forma de cáncer. La transferencia de un gen *bcl-2* clonado de humanos en embriones de *C. elegans* mutantes nulos para ced-9 evita la apoptosis, indicando que los nematodos y los mamíferos comparten una ruta común para este proceso. Así, la homología entre las moléculas y los mecanismos entre especies a lo largo del árbol filogenético, discutido a lo largo de este capítulo, se extiende a las moléculas y mecanismos requeridos para que las células mueran.

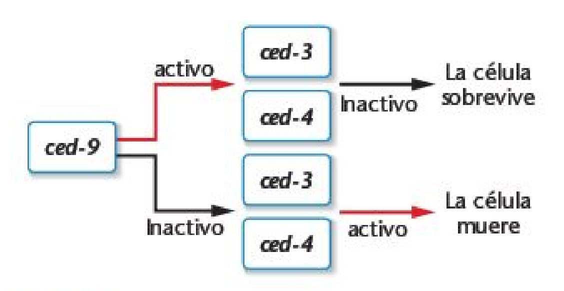


FIGURA 23.32 En la ruta genética que controla la muerte celular, el gen ced-9 actúa como un conmutador binario. Si *ced-9* está activo, reprime la expresión de *ced-3* y *ced-4*, y la célula vive. Si *ced-9* está inactivo, *ced-3* y *ced-4* se expresan y la célula muere.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Las guerras de las células madre

La investigación de las células madre se encuentra en el centro de una batalla librada por los científicos, políticos, bufetes de abogados, líderes religiosos y expertos en ética. Los partidarios luchan por el derecho a llevar a cabo investigaciones en las células madre, reclamando que es revolucionario, si no milagroso —con el potencial de curar la diabetes, la enfermedad de Parkinson y las dolencias de la espina dorsal, y también de mejorar la calidad de vida de millones de individuos. La camarilla opuesta pide el fin de la investigación en las células madre, advirtiendo que ello nos empujará a una pendiente resbaladiza hacia el menosprecio de la vida humana. Aunque la investigación en las células madre es el foco

de las proclamas presidenciales, de grandes campañas publicitarias en los medios y de prohibiciones legislativas, pocos de nosotros entendemos suficientemente como para evaluar los pros y los contras. ¿Qué es la investigación en células madre, y por qué ha levantado tan intensa controversia?

Las células madre son células primitivas que se replican de manera indefinida y tienen la especial capacidad para diferenciarse en células con funciones especializadas, como las que se encuentran en el corazón, cerebro, hígado y músculo. Las células madre son el origen de todas las células que forman parte, aproximadamente, en 200 tipos distintos de tejidos de nuestro organismo. En contraste con las células madre, las células maduras, completamente diferenciadas, no se replican o no pueden transformarse en tipos celulares diferentes. Algunos tipos de células madre se definen como *totipotentes*, que quiere decir que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular maduro del organismo. Otros tipos de células madre son pluripotentes y pueden diferenciarse en sólo uno de los tipos celulares maduros.

Hace relativamente pocos años, varios grupos de investigación aislaron y cultivaron células madre pluripotentes humanas. Estas células permanecen sin diferenciar y crecen indefinidamente en placas de cultivo. Cuando se tratan con factores de crecimiento o con hormonas, estas células madre pluripotentes se diferencian en células que tienen características de células nerviosas, óseas, renales, hepáticas, cardíacas o pancreáticas.

El hecho de que las células madre pluripotentes crezcan prolíficamente en cultivos y se diferencien en células más especializadas ha creado gran expectación. Algunos prevén un día en el que las células madre puedan ser un cuerno de la abundancia del que se coseche un número ilimitado de células especializadas para reemplazar células dañadas en tejidos enfermos. Por ello, las células madre podrían utilizarse para tratar la enfermedad de Parkinson, fallos renales y hepáticos, enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular de Duchenne y daños en la espina dorsal. Algunos predicen que las células madre se modificarán genéticamente para eliminar el rechazo en transplantes o para producir determinados productos génicos específicos, corrigiendo por consiguiente defectos genéticos o tratando el cáncer. La excitación sobre las terapias con células madre se ha alimentado por publicaciones de experimentos en animales que han tenido mucho éxito. Por ejemplo, ratones con daños en la espina dorsal recobraron la movilidad y el control de intestinos y vejiga después de que se les inyectaran células madre humanas. Tanto los partidarios como los críticos de la investigación con células madre están de acuerdo en que la terapia con células madre podría ser revolucionaria. Entonces, ¿por qué tal polémica por la investigación con células madre?

La respuesta a dicha pregunta se encuentra en el origen de las células madre pluripotentes. Hasta la fecha, todas las líneas de células madre pluripotentes se han obtenido de blastocistos embrionarios de cinco días. Los blastocistos en ese momento constan de unas 2.110 células, muchas de las cuales se desarrollan en la placenta y en los tejidos de soporte del embrión temprano. La masa celular interna de los blastocistos consta de unas 30 a 40 células madre pluripotentes que darán lugar a todos los tejidos del embrión. La fecundación clínica *in vitro* desarrolla óvulos fecundados hasta el estadio de blastocisto de cinco días antes de su transferencia al útero. Las líneas de células madres embrionarias (ES) se obtienen extrayendo por disección la masa de células interna del blastocisto de cinco días y cultivando las células no diferenciadas en placas de cultivo. Todas las líneas celulares ES humanas provienen de blastocistos de cinco días no utilizados, que fueron descartados en la fecundación *in vitro*.

El hecho de que se destruyan embriones en sus primeras fases para establecer líneas celulares ES humanas preocupa a la gente que cree que los embriones antes de implantarlos son personas con derechos; sin embargo, no preocupa a personas que creen que estos embriones son demasiado primitivos como para que tengan un estatus moral inherente. Ambos lados del debate emplean prolijos argumentos dando vueltas alrededor de cuestiones fundamentales de lo que constituye un ser humano.

Los contrarios a la investigación en células ES arguyen que podemos beneficiarnos de la terapia con células madre sin recurrir a la utilización de células ES. Este argumento se basa en publicaciones recientes acerca de la plasticidad de las células madre adultas. Las células madre adultas son células no diferenciadas que se encuentran en tejidos diferenciados como la sangre y el cerebro. Se dividen dentro de los tejidos diferenciados y se diferencian en células maduras que forman el tejido en donde se encuentran. Se han encontrado células madre adultas en la médula ósea, la sangre, la retina, el cerebro, en el músculo estriado, el hígado, la piel y el páncreas. Las células madre adultas mejor conocidas son las del sistema hematopoyético (HSC) que se encuentran en la médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical. El HSC se diferencia en tipos celulares sanguíneos maduros, como los glóbulos rojos, linfocitos y macrófagos. El HSC se ha utilizado clínicamente durante muchos años como material de transplante para reconstruir el sistema inmunitario de pacientes que sufren tratamiento por cáncer y enfermedades autoinmunes. Es interesante que estudios recientes sugieren que las células madre adultas pueden tener la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares.

Aunque estas publicaciones son fascinantes, todavía es pronto para saber si las células madre adultas mantendrán la misma promesa de pluripotencia como las células ES. Las células madre adultas son escasas, difíciles de identificar y de aislar y crecen poco, si lo hacen, en cultivo. Sin embargo, si estos obstáculos se pudieran eliminar, las células madre adultas podrían proporcionar una alternativa ética a las células ES y calmar el agrio debate. Por otro lado, podrían crearse nuevos dilemas filosóficos. Si las células madre adultas presentaran la misma pluripotencia que las células ES, podrían tener el mismo potencial para dar origen a un embrión humano —críticos y partidarios de la investigación con células madre volverían al mismo atolladero moral. En el momento actual, es imposible predecir si las células madre adultas o embrionarias serán tan milagrosas como predicen los científicos y la prensa popular. Pero si la investigación en células madre progresa en su rápida marcha actual, no tendremos que esperar mucho.

Referencias

Robertson, J.A. 2001. Human embryonic item cell research; ethical and legal sigues: *Nat. Rev. Gen.* 2:74-78

Freed, C.R. 2002. Will embryonic atem cells be a useful source of dopamine neurons for transplant into patients with Parkinson's disease? *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* 99:1755-57

Páginas Web

Nacional Institutes of Health. 2001. «Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions.»

http://stemcells.nih.gov/info/scireport (o para la versión en pdf: http://stemcells.nih.gov/info/scireport/PDFs/fullrpstem.pff)

Nacional Institutes of Health. 2004. «Stem cell information»

http://stemcells.nih.gov/index.asp

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. El papel de la información genética durante el desarrollo y la diferenciación es una de las cuestiones principales en biología y se ha estudiado intensamente. Los genéticos están explorando esta cuestión aislando mutaciones del desarrollo e identificando los genes implicados en el proceso del control de desarrollo.
2. La determinación es el suceso regulador mediante el que se fija el destino celular durante el desarrollo temprano. La determinación precede a la diferenciación o especialización real de los diferentes tipos celulares.
3. Durante la embriogénesis, la actividad génica específica parece que se ve afectada por el ambiente interno o por componentes localizados en el citoplasma. La regulación de los sucesos tempranos está mediatizada por el citoplasma materno, que entonces influye en la expresión de los genes zigóticos. Al proseguir el desarrollo, tanto el ambiente interno de la célula como su ambiente externo queda alterado por la presencia de productos génicos tempranos y por la comunicación con otras células.
4. En *Drosophila*, tanto las investigaciones genéticas como las moleculares han confirmado que el óvulo tiene información que especifica el plan corporal de la larva y del adulto, y que la interacción de los núcleos embrionarios con el citoplasma materno inicia los programas transcripcionales característicos de las rutas de desarrollo específicas.
5. Amplios análisis genéticos del desarrollo embrionario en *Drosophila* han conducido a la identificación de genes de efecto materno que establecen los ejes embrionarios antero-posterior y dorso-ventral. Además, estos genes de efecto materno activan grupos de genes zigóticos de segmentación, iniciando una cascada de regulación génica que finaliza con la determinación de la identidad de segmentos por genes selectores.
6. En *C. elegans*, el estereotipado linaje de todas las células permite a los biólogos del desarrollo estudiar la señalización célula-célula requerida por la organogénesis y determinar qué genes se necesitan para el proceso normal de la muerte celular programada.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. En el moho *Dictyostelium*, las pruebas experimentales sugieren que el AMP cíclico (cAMP) juega un papel central en el programa de desarrollo que conduce a la formación de esporas. Se han clonado los genes que codifican al receptor de superficie celular del cAMP, y se conoce la secuencia aminoacídica de los componentes de la proteína. Para formar estructuras reproductoras, se agregan células individuales de vida libre y después se diferencian en dos tipos celulares: las células de las protoesporas y las células del protopedúnculo. Cuando las células se agregan, secretan ondas o fluctuaciones del cAMP para fomentar la agregación celular, y después secretan continuamente cAMP para activar a genes de las células agregadas en estadios más tardíos del desarrollo. Se ha propuesto que el cAMP controla las interacciones célula-célula y la expresión génica. Es importante comprobar esta hipótesis utilizando diversas técnicas experimentales. ¿Qué diferente enfoque puede diseñar para comprobar esta hipótesis, y qué sistema experimental específico utilizaría para comprobarlo?

Solución: Dos de las formas más potentes de análisis en biología implican la utilización de análogos bioquímicos (o inhibidores) para bloquear la transcripción génica o la acción de los productos génicos de manera predecible, y la utilización de mutaciones para alterar los genes y sus productos. Estos dos enfoques se pueden utilizar para investigar la función del cAMP en el programa de desarrollo de *Dictyostelium*. Primero, pueden utilizarse compuestos químicos relacionados con el cAMP, como GTP y GDP, para probar si tienen algún efecto en el proceso controlado por cAMP. De hecho, tanto GTP como GDP disminuyen la afinidad de los receptores de superficie celular para el cAMP, bloqueando de manera efectiva la acción del cAMP. Para inhibir la síntesis del receptor del cAMP, es posible construir un vector que contenga una secuencia de DNA que transcriba un RNA antisentido (una molécula que tiene la secuencia de bases complementaria al mRNA). El RNA antisentido forma una estructura de doble cadena con el mRNA, evitando que se transcriba. Si se transforman células normales con un vector que exprese RNA antisentido no se producirán receptores del cAMP. Es posible predecir que estas células no responderán al gradiente del cAMP y, en consecuencia, no emigrarán hacia un centro de agregación. En realidad, esto es lo que sucede. Estas células permanecen dispersas y no emigran en presencia del cAMP. Del mismo modo, es posible determinar si esta respuesta al cAMP es necesaria para provocar los cambios en el programa transcripcional analizando la expresión de genes regulados durante el desarrollo en células que expresan este RNA antisentido.

El análisis mutacional puede utilizarse para diseccionar los componentes del sistema receptor del cAMP. Una manera de hacerlo es utilizar la transformación con genes silvestres para restablecer la función mutante. Del mismo modo, puesto que se han clonado los genes de las proteínas receptoras, es posible construir mutantes con alteraciones conocidas en los componentes proteicos y transformarlos en células para evaluar sus efectos.

2. En el erizo de mar, el desarrollo hasta la gastrulación puede darse incluso en presencia de actinomicina D, que inhibe la síntesis del RNA. Sin embargo, si hay actinomicina D en el desarrollo temprano, pero se elimina al final de la formación de la blástula, no se produce gastrulación. De hecho, si la actinomicina D está presente sólo entre la sexta y la undécima hora del desarrollo, la gastrulación (que normalmente se produce en la decimoquinta hora) se detiene. ¿Qué conclusiones se pueden deducir en relación con el papel de la transcripción génica entre las seis y las quince horas?

Solución: Los RNA maternos se encuentran en el huevo fecundado de erizo de mar. Así, puede tener lugar una considerable cantidad de desarrollo sin la transcripción del genoma del embrión. Ya que la gastrulación queda inhibida por el anterior tratamiento con actinomicina D, parece que se necesitan los transcritos del genoma del embrión para iniciar o mantener la gastrulación. Esta transcripción debe tener lugar entre la sexta y la decimoquinta hora del desarrollo.

3. Si fuera posible introducir uno de los genes homeóticos de *Drosophila* en un embrión homozigoto de *Arabidopsis* para un gen homeótico de floración, ¿se esperaría que cualquiera de los genes de *Drosophila* anulara (rescatara) al fenotipo mutante de *Arabidopsis*? ¿Por qué sí o por qué no?

Solución: Los genes homeóticos de *Drosophila* pertenecen a la familia génica *Hox*, mientras que los genes homeóticos de *Arabidopsis* pertenecen a la familia proteica de la caja MAD. Ambas familias génicas se encuentran tanto en *Drosophila* como en *Arabidopsis*, pero han evolucionado funciones distintas en los reinos animal y vegetal. Por ello, es improbable que un gen *Hox* de *Drosophila* transferido rescatara el fenotipo de un mutante de la caja MAD, pero sólo un experimento real lo confirmaría.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Distinga cuidadosamente entre los términos *diferenciación* y *determinación*. ¿Qué fenómeno se produce inicialmente durante el desarrollo?

2. En oocitos de *Xenopus* se pueden inyectar núcleos de casi cualquier origen. Los estudios han demostrado que estos núcleos permanecen activos en cuanto a transcripción y traducción. ¿De qué manera puede ser útil tal sistema experimental en estudios genéticos del desarrollo?

3. La doctrina del homunculus postulaba que dentro del huevo había un adulto completo en miniatura y simplemente se desplegaba y crecía para dar lugar a un organismo adulto. ¿Qué tipos de pruebas aisladas presentadas en este capítulo podrían haber conducido a esta doctrina? ¿Por qué se mantiene en la actualidad que la teoría epigenética es la correcta?

4. (a) ¿Qué son los discos imaginales de *Drosophila*? (b) ¿Cuándo se forman, cuántos hay y qué estructuras forman en el adulto?

5. Distinga entre el estadio blastodérmico sincitial y el estadio blastodérmico celular en la embriogénesis de *Drosophila*.

6. (a) ¿Qué son los genes de efecto materno? (b) ¿Qué hacen los productos de estos genes y donde se sitúan? (c) ¿Qué aspectos del desarrollo controlan los genes de efecto materno? (d) ¿Cuál es el fenotipo de las mutaciones de efecto materno?

7. Suponga que inicia la búsqueda de mutaciones de efecto materno en *Drosophila* que afecten a las estructuras externas del embrión y en su búsqueda identifica a más de 100 mutaciones que afectan a las estructuras externas. Weischaus y Schüpbach estimaron en su búsqueda que hay unos 40 genes de efecto materno. ¿Cómo reconciliaría estos distintos resultados?

8. (a) ¿Qué son los genes zigóticos y cuando se fabrican sus productos génicos? (b) ¿Cuál es el fenotipo asociado con las mutaciones génicas zigóticas? El genotipo materno ¿tiene genes zigóticos?

9. Haga una lista de las clases principales de genes zigóticos. ¿Cuál es la función de cada una de estas clases de genes?

10. Se ha demostrado experimentalmente que cualquier núcleo situado en el citoplasma polar del polo posterior del huevo de *Drosophila* se diferenciará en célula germinal. Si se transplanta el citoplasma polar al extremo anterior del huevo, justo antes de la fecundación, ¿qué le sucederían a los núcleos que migrasen a este citoplasma del polo anterior?

11. ¿Cómo puede determinar si un gen concreto se está transcribiendo en diferentes tipos celulares?

12. Si se observa que un gen concreto se está transcribiendo durante el desarrollo, ¿cómo puede decir si la expresión de este gen está bajo control transcripcional o traduccional?

13. ¿Qué son los genes *Hox*? ¿Qué propiedades tienen en común? Los genes homeóticos ¿son todos genes *Hox*?

14. La mutación homeótica *Antennapedia* da lugar a un mutante de *Drosophila* que tienen patas en lugar de antenas y es una mutación dominante de ganancia de función. ¿Cuáles son las propiedades de tales mutaciones? ¿De qué manera el gen *Antennapedia* cambia la antena en pata?

15. La mutación homeótica de *Drosophila spineless aristapedia* (ss^a) resulta en la formación de una estructura tarsal en miniatura (normalmente parte de la extremidad) en el extremo de la antena. Por lo que sabe de los discos imaginales, ¿qué ideas proporciona este mutante sobre la función de los genes durante el desarrollo?

16. La embriogénesis y la oncogénesis (formación del cáncer) comparten ciertos rasgos, como la proliferación celular, la apoptosis, la migración e invasión celular, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la actividad génica diferencial. Las células embrionarias son relativamente no diferenciadas y las células cancerígenas parece que son no diferenciadas o diferenciadas. La expresión de los genes homeóticos dirige el desarrollo temprano y la expresión mutante da lugar a la pérdida del estado diferenciado o a una identidad celular alternativa. M.T. Lewis (2000. *Breast Can. Res.* 2:158-69) sugería que los cánceres de mama se pueden producir por alteraciones de la expresión de genes homeóticos. Cuando examinó 11 de tales genes en cánceres, ocho se expresaban menos y tres se expresaban más en relación con los controles. Dado lo que sabe acerca de los genes homeóticos, ¿cuál es la probabilidad de que estén implicados en la oncogénesis?

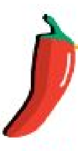
17. Los genes *fushi tarazu* (*ftz*) y *engrailed* de *Drosophila* codifican factores de transcripción con caja homeótica y pueden provocar la expresión de otros genes. Ambos genes actúan aproximadamente en el mismo momento durante el desarrollo y en la misma región para especificar destinos celulares en los segmentos corporales. Para descubrir si *ftz* regula la expresión de *engrailed* o si *engrailed* regula a *ftz*, o si ambos están regulados por otro gen, se realizó un análisis mutacional. En embriones ftz^- (*ftz*/*ftz*), no

hay proteína *engrailed*; en embriones *engrailed*⁻ (*eng/eng*), la expresión de *ftz* es normal. ¿Qué nos dice esto de la regulación de estos dos genes -el gen *englailed* regula a *ftz* o el gen *ftz* regula a *engrailed*?

18. El desarrollo temprano depende de la interrelación temporal y espacial entre materiales y mRNA suministrados por la madre y el inicio de la expresión de los genes del zigoto. Se tienen que producir, situar y degradar mRNA codificados por la madre (Surdej and Jacobs-Lorena, 1998. *Mol. Cell Biol.* 18:2892-2900). Por ejemplo, la transcripción del gen *bicoid,* que determina la polaridad antero-posterior en *Drosophila,* es materna. El mRNA se sintetiza en el ovario por células nodrizas y luego se transporta al oocito, en donde se localiza en el extremo anterior. Después de la puesta del huevo, se traduce el mRNA de *bicoid* y la proteína bicoid, que es inestable, forma un gradiente decreciente de concentración a partir del extremo anterior del embrión, activándose los genes *gap* a lo largo de la mitad anterior del embrión. Al comienzo de la gastrulación se ha degradado el mRNA de *bicoid*. Considere dos modelos para explicar la degradación del mRNA de *bicoid*: (1) la degradación puede ser el resultado de señales internas del mRNA (modelo intrínseco), o (2) la degradación puede ser el resultado de la situación de los mRNA dentro del huevo (modelo extrínseco). Experimentalmente, ¿cómo se podrían distinguir estos dos modelos?

19. La formación de las células germinales en *Drosophila* y en muchos otros embriones depende de su posición en el embrión y de su exposición a determinantes citoplásmicos localizados. Los núcleos expuestos al citoplasma en el extremo posterior de los huevos de *Drosophila* (el polo plasmático) forman células que se desarrollan en células germinales bajo la dirección de componentes derivados de la madre. R. Amikura et al. (2001. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 98:9133-38) encontraron consistentemente ribosomas mitocondriales fuera de las mitocondrias, en el plasma germinal de los embriones de *Drosophila*, y postularon que estaban íntimamente relacionados con la especificación de las células germinales. Si estuviera estudiando este fenómeno, ¿qué es lo que desearía saber acerca de la actividad de estos ribosomas?

20. Uno de los aspectos más interesantes del desarrollo temprano es la remodelación del ciclo celular de divisiones celulares rápidas, que prácticamente carecen de las fase G1 y G2, a ciclos celulares más lentos con fases G1 y G2 mensurables y puntos de control. Durante la remodelación, los mRNA maternos que especifican ciclinas son desadenilados y se activan los genes zigóticos para producir ciclinas. Audic et al. (2001. *Mol Cell Biol.* 21:1662-71) sugieren que la desadenilación requiere la transcripción de genes zigóticos. Haga un esquema que contenga los aspectos más significativos de estos descubrimientos.



Problemas extra-picantes

21. Al estudiar la acción génica durante el desarrollo, es deseable poder posicionar los genes en una jerarquía o en una ruta de actuación para establecer qué genes son los primarios o principales y en qué orden actúan. Hay varias maneras de hacerlo. Una es construir mutantes dobles y estudiar el resultado. El gen *fushi-tarazu* (*ftz*) se expresa en embriones tempranos, en el estadio de siete bandas. Todos los genes implicados en la formación del patrón antero-posterior afectan a la expresión de este gen, como lo hacen los genes gap. Sin embargo, *ftz* afecta a la expresión de los genes de la polaridad de los segmentos. ¿Cuál es la situación de *ftz* en esta jerarquía?

22. En *Drosophila* se han identificado ciertos genes que controlan la expresión de los genes *Hox*. Uno de estos mutantes homozigotos es *extra sex combs*, en donde algo de la cabeza y todos los segmentos torácicos y abdominales se desarrollan como el último segmento abdominal. En otras palabras, todos los segmentos afectados se desarrollan como segmentos posteriores. ¿Qué le dice este fenotipo acerca de qué grupo de genes *Hox* están controlados por el gen *extra sex combs*?

23. El gen *apterous* de *Drosophila* codifica una proteína necesaria para el modelado del ala y su crecimiento. Se sabe que también funciona en el desarrollo nervioso, fertilidad y viabilidad. Cuando se utilizaron genes humanos y de ratón, cuyos productos proteicos se parecen mucho a *apterous*, para generar una *Drosophila* transgénica (Rincon-Limas et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.*[USA] 96:2165-70), *se rescató* el fenotipo mutante *apterous*. Además, los patrones de expresión de todo el cuerpo en la *Drosophila* transgénica eran similares a *apterous* normal. (a) ¿Cuál es el significado del término *se rescató* en este contexto? (b) ¿Qué indican estos resultados acerca de la naturaleza molecular del desarrollo?

24. En *Arabidopsis*, el desarrollo de la flor está controlada por grupos de genes homeóticos. ¿Cuántas clases hay de estos genes y que estructuras forman por su expresión individual o combinada?

25. Los genes florales homeóticos de *Arabidopsis* son proteínas de la caja MADS, mientras que en *Drosophila* hay genes *Hox*, que pertenecen a la familia génica homeobox. Tanto en *Arabidopsis* como en *Drosophila*, miembros de la familia génica *Polycomb* controlan la expresión de estos genes homeóticos divergentes. ¿Cómo controlan los genes *Polycomb* la expresión de dos grupos de genes homeóticos tan diferentes?

26. El desarrollo de la vulva en *C. elegans* comienza con la interacción entre dos células vecinas (Z1.ppp y Z4.aaa) mediante señales célula-célula que implican a dos componentes: una molécula señal que se une a membrana y un receptor unido en membrana. Por azar, una célula produce más señal y da lugar a que la vecina produzca más receptor. La célula que produce la señal se convierte en la célula de anclaje y la célula que produce el receptor se convierte en el precursor uterino. Esta forma de interacción célula-célula se denomina sistema de señalización Notch-Delta. Aunque en los metazoos es un mecanismo de señalización ampliamente utilizado, esta ruta actúa sólo en células adyacentes. ¿Por qué es así, y cuáles son las ventajas y desventajas de tal sistema?

27. La identificación y caracterización de los genes que controlan la determinación del sexo ha sido otro de los objetivos de los investigadores que utilizan *C. elegans*. Como en *Drosophila*, en este organismo el sexo se determina mediante la proporción de cromosomas X y dotaciones de autosomas. Un macho silvestre diploide tiene un cromosoma X, y un hermafrodita silvestre diploide tiene dos. Se han identificado muchas mutaciones diferentes que afectan a la determinación del sexo. Las mutaciones de pérdida de función en el gen llamado *her-1*, hacen que un nemátodo XO se desarrolle como hermafrodita, y no tiene ningún efecto sobre el desarrollo de los XX. (Es decir, los nemátodos XX son hermafroditas normales.) En cambio, la mutación de pérdida de función en un gen denominado *tra-1* hace que un nemátodo XX se desarrolle como macho. Deduzca, a partir de esta información, los papeles de estos genes en la determinación normal del sexo.

28. Basándose en la información del Problema 27 y en el análisis de los fenotipos de cepas mutantes simples y dobles, se ha generado un modelo de la determinación del sexo en *C. elegans*. Este modelo propone que el gen *her-1* controla la determinación del sexo estableciendo el nivel de actividad del gen *tra-1*, que a su vez controla la expresión de los genes implicados en la generación de diferentes tejidos con dimorfismo sexual. Dada esta información, (a) ¿tiene el producto del gen *her-1* un efecto negativo o positivo sobre la actividad del gen *tra-1*? (b) ¿Cuál sería el fenotipo del mutante doble *tra-1*, *her-1*?

LECTURAS SELECCIONADAS

Baker, N.E. 2001. Master regulatory genes: telling them what to do. *BioEssays* 23:763-66.

Goodman, F. 2002. Limb malformations and the human *HOX* genes. *Am. J. Med. Genet.* 112:256-65.

Gridley, T. 2003. Notch signaling and inherited human diseases. *Hum. Mol. Genet.* 12:R9-R13.

Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788-92.

Kumar, J.P., and Moses, K. 2001. EGF receptor and Notch signaling act upstream of eyeless/PAX6 to control eye specification. *Cell* 104:687-97.

Lall, S., and Patel, N.H. 2001. Conservation and divergence in molecular mechanisms of axis formation. *Annu. Rev. Genet.* 35:407-37.

Nüsslein-Volhard, C., and Weischaus, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801.

Pires-daSilva, A., and Sommer, R.J. 2002. The evolution of signaling pathways in animal development. *Nature Rev. Genet.* 4:39-49.

Rudel, D., and Sommer, R.J. 2003. The evolution of developmental mechanisms. *Dev. Biol.* 264:15-37.

Verakasa, A., Del Campo, M., and McGinnis, W. 2000. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol. Genet. Metabol.* 69:85-100.

Wang, M., and Sternberg, P.W. 2001. Pattern formation during *C. elegans* vulval induction. *Curr. Top. Dev. Biol.* 51:189-220.

Genética cuantitativa y caracteres multifactoriales

CAPÍTULO VEINTICUATRO



Campo de calabazas, en las que el tamaño esta bajo control poligénico.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- La herencia cuantitativa da lugar a un rango de fenotipos mensurables para un carácter poligénico.
- No todos los caracteres poligénicos muestran variación continua.
- Los caracteres cuantitativos se pueden explicar en términos mendelianos.
- El estudio de los caracteres poligénicos depende del análisis estadístico.
- La heredabilidad estima la contribución genética a la variabilidad fenotípica.
- El estudio de gemelos permite una estima de la heredabilidad en la especie humana.
- Los loci de los caracteres cuantitativos se pueden cartografiar.

Hemos considerado ejemplos de variación fenotípica que se pueden clasificar en categorías distintas: las plantas de guisante son altas o enanas; la forma de la calabaza es esférica, discoidal o alargada; el color del ojo de la mosca de la fruta es rojo o blanco. (Véase el Capítulo 4.) Caracteres como estos, con un pequeño número de fenotipos discretos, presentan **variación discontinua**. En estos caracteres, normalmente un genotipo producirá un único fenotipo identificable, aunque fenómenos como la penetración y expresividad variables, la pleiotropía y la epistasia, pueden oscurecer las relaciones entre el genotipo y el fenotipo, incluso para caracteres discontinuos sencillos. Sin embargo, otros caracteres, como muchos de importancia médica o agrícola, son más complejos. Muestran mucha más variación, con un rango continuo de fenotipos que no se pueden clasificar fácilmente en categorías distintas. Ejemplos de tales caracteres que presentan **variación continua** son la estatura o el peso en la especie humana, la producción de leche o carne en el ganado vacuno, la producción de cosechas o el contenido proteico de las semillas. La variación continua a lo largo de un rango de fenotipos se mide y se describe en términos cuantitativos, por lo que este fenómeno genético se conoce como **herencia cuantitativa**. Debido a que la variación fenotípica resulta del concurso de genes de múltiples loci, los caracteres cuantitativos se denominan a menudo **poligénicos** (literalmente «muchos genes»). Para caracteres que muestran variación continua, el genotipo que se genera en la fecundación establece el rango cuantitativo dentro del cual puede caer un individuo dado. Sin embargo, el fenotipo final viene a menudo influenciado por los factores ambientales a los que este individuo está expuesto. Por ejemplo, la estatura humana está parcialmente determinada por el genotipo, pero también está afectada por factores ambientales, como la nutrición. Los términos **complejo** y **multifactorial** se utilizan para describir caracteres en donde se produce un rango de fenotipos como consecuencia de la acción génica y de influencias ambientales.

En este capítulo examinaremos ejemplos de herencia cuantitativa y algunas de las técnicas estadísticas utilizadas para estudiar los caracteres complejos. También consideraremos como los genéticos estiman la importancia relativa de los factores genéticos respecto de los factores ambientales que contribuyen a la variación fenotípica continua y discutiremos maneras de cartografiar y caracterizar genes cuantitativos en el genoma.

24.1 No todos los caracteres poligénicos presentan variación continua

Cuando se examina un carácter continuo en una población, las medidas individuales forman una gradación de fenotipos sin clases definidas. Para un carácter regulado por un único gen, es posible presentar una gradación de fenotipos en una población, si por ejemplo hay diferentes grados de penetración entre los individuos. Caracteres de un solo gen pueden ser también multifactoriales si la interacción de los alelos con el ambiente da lugar a un rango de fenotipos distintos. Sin embargo, muy a menudo, un carácter cuantitativo continuo es el resultado de herencia poligénica, y los caracteres poligénicos son frecuentemente multifactoriales, con factores ambientales que contribuyen al rango de fenotipos observado.

Además de los caracteres de variación continua, en donde la variación fenotípica puede encontrarse en cualquier punto a lo largo de una escala de medidas, hay otras dos clases de caracteres poligénicos. Los caracteres **merísticos**, en los que los fenotipos se expresan en número enteros. Ejemplos de caracteres merísticos son el número de semillas en una vaina o el número de huevos puestos por una gallina en un año. Esto son caracteres cuantitativos, pero no tienen un rango continuo de fenotipos: por ejemplo, una vaina puede tener 2, 4 ó 6 semillas, pero no 5,75. Los **caracteres umbral** son poligénicos (y frecuentemente los factores ambientales afectan a los fenotipos, por lo que también son multifactoriales), pero se distinguen de los caracteres continuos y merísticos por tener un pequeño número de clases fenotípicas discretas. Los caracteres umbral son de interés para los especialistas en genética humana, ya que cada vez hay un mayor número de enfermedades que se sospecha presentan este tipo de herencia poligénica. Un ejemplo es la diabetes Tipo II, también conocida como diabetes de aparición tardía, porque afecta típicamente a individuos de mediana edad o mayores. Una población se puede dividir en dos clases fenotípicas para este carácter —individuos que tienen la diabetes Tipo II y los que no la tienen— por lo que a primera vista puede parecer más próximo a un carácter monogénico sencillo. Sin embargo, no se ha identificado un gen para la aparición de la diabetes en el adulto. Más bien, la combinación de alelos en muchos loci da al individuo una mayor o menor probabilidad de desarrollar la enfermedad. Estos niveles variables de riesgo forman un rango continuo: En un extremo de la distribución se encuentran aquellos con muy poco riesgo de padecer la diabetes Tipo II, mientras que al otro extremo se encuentran aquellos cuyos genotipos les hace altamente probables para desarrollar la enfermedad (Figura 24.1). Como con muchos caracteres umbral, los factores ambienta-

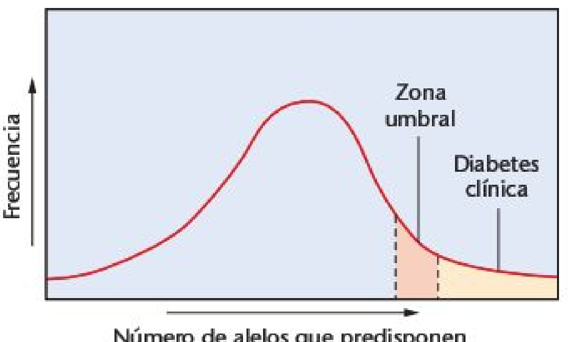


FIGURA 24.1 Carácter con umbral-diabetes tipo II.

les también juegan un papel en la determinación del fenotipo final, teniendo la dieta y el estilo de vida un impacto significativo en si individuos con moderada a alta probabilidad genética desarrollarán realmente la diabetes Tipo II.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo sabemos que los caracteres umbral son realmente poligénicos, aun cuando pueden tener tan pocas clases fenotípicas discretas como sólo dos?

24.2 Los caracteres cuantitativos se pueden explicar en términos mendelianos

La idea de si la variación fenotípica continua podría explicarse en términos mendelianos, dio lugar a considerable controversia a principios del siglo XX. Algunos científicos argüían que aunque los factores o genes de Mendel explicaban patrones de segregación discontinua con clases fenotípicas discretas, no podrían explicar también el rango de fenotipos que se observa en patrones de herencia cuantitativa. Sin embargo, genéticos como William Bateson y Gudny Yule, partidarios de una explicación mendeliana, propusieron la **hipótesis de los factores múltiples** según la cual, muchos genes, comportándose cada uno de ellos de modo mendeliano, contribuirían al fenotipo de un modo *acumulativo* o *cuantitativo*.

La hipótesis de los factores múltiples para la herencia cuantitativa

La hipótesis de los factores múltiples se basó en gran parte en un grupo clave de resultados experimentales publicados en 1909 por Hermann Nilsson-Ehle. Nilsson-Ehle utilizó el color del grano de trigo para comprobar el concepto de que el efecto acumulativo de alelos en múltiples loci daba lugar al rango de fenotipos que se observa en los caracteres cuantitativos. En una serie de experimentos, cruzó trigo con granos rojos con trigo con granos blancos (Figura 24.2). La F_1 presentó un color rosa intermedio, que a primera vista sugería dominancia incompleta entre los dos alelos de un locus. Sin embargo, en F_2, Nilsson-Ehle no observó la típica segregación 3:1 de un cruce monohíbrido. En su lugar, aproximadamente el 15/16 de las plantas presentaban algún grado de color rojo en los granos, mientras que el 1/16 de las plantas presentaba granos blancos. Un examen cuidadoso de la F_2 reveló que el color de los granos podía clasificarse en cuatro tonalidades de rojo diferentes. Ya que la proporción en F_2 se daba en dieciseisavos parecía como si dos genes, cada uno con dos alelos, controlaba el fenotipo y segregaban independientemente uno del otro de un modo mendeliano.

Si cada gen tiene un potencial **alelo aditivo** que contribuye al color rojo del grano y un potencial **alelo no aditivo** que no produce pigmento rojo, vemos de qué manera la hipótesis de los factores múltiples podría explicar los diferentes fenotipos de color de los granos. En P_1 ambos padres serían homozigotos; el padre rojo tendría sólo alelos aditivos (AABB en la Figura 24.2), mientras que el padre blanco tendría sólo alelos no aditivos (aabb). La F_1, al ser heterozigota AaBb, tendría sólo dos alelos aditivos (A y B) y dos no aditivos (a y b), y expresaría un fenotipo rosa intermedio. En F_2, cada descendiente tendría 4, 3, 2, 1 o 0 alelos aditivos. Las plantas F_2 sin ningún alelo aditivo (1/16) serían blancas (aabb) como uno de los padres P_1,

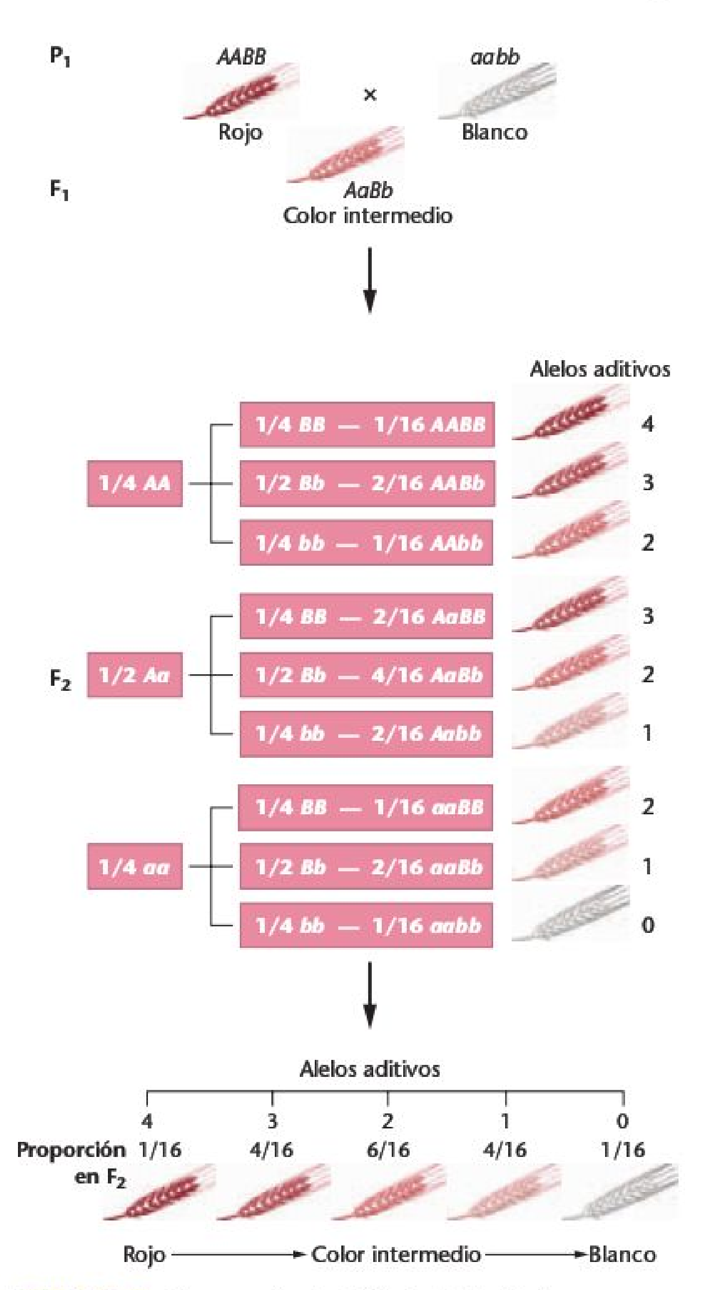


FIGURA 24.2 Cómo explica la hipótesis de los factores múltiples la proporción fenotípica 1:4:6:4:1 del color del grano cuando todos los alelos en mayúscula son aditivos y contribuyen con igual cantidad de pigmento al fenotipo.

mientras que las plantas F_2 con 4 alelos aditivos serían rojas (AABB) como el otro padre P_1. Las plantas con 3, 2 y 1 alelos aditivos constituyen las otras tres categorías de color rojo observadas en F_2. A mayor número de alelos aditivos en el genotipo, se expresaría un rojo más intenso, ya que cada alelo aditivo contribuye lo mismo a la cantidad acumulativa de pigmento producido en el grano.

Los resultados de Nilsson-Ehle demostraban cómo la variación continua podía explicarse de modo mendeliano, con alelos aditivos en múltiples loci influyendo en el fenotipo de una manera cuantitativa, pero segregando cada alelo de acuerdo con las leyes mendelianas. Como vimos en el cruce inicial de Nilsson-Ehle, si estuvieran implicados dos loci, cada uno con dos alelos, entonces esperaríamos cinco clases fenotípicas en F_2, en una proporción 1:4:6:4:1 Sin embargo, no hay razones para que no puedan funcionar de manera similar tres, cuatro o más loci en el control de varios fenotipos cuantitativos. A más loci cuantitativos implicados, aparecería un mayor número de clases en F_2 en proporciones más complejas. En la Figura 24.3 se ilustra el número de fenotipos y las proporciones esperadas en F_2 para cruces que impliquen hasta cinco pares de genes.

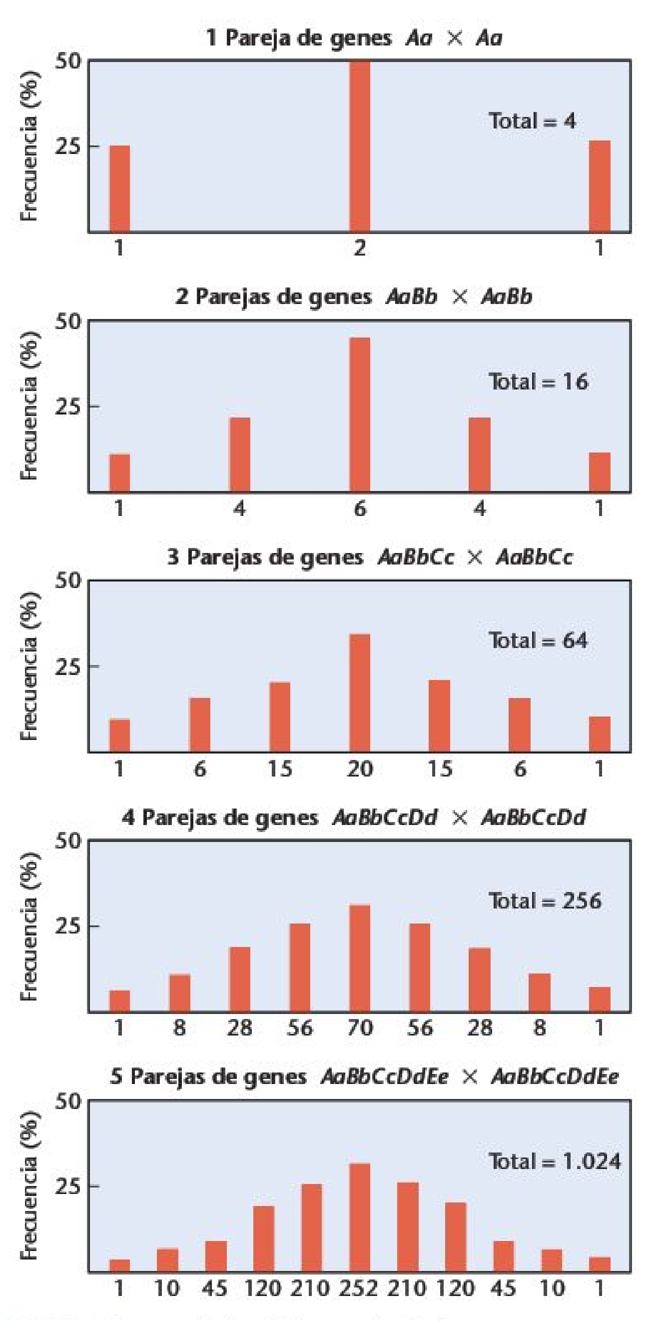


FIGURA 24.3 Resultados del cruce de dos heterozigotos cuando actúa la herencia poligénica con 1 a 5 pares de genes. Cada barra de los histogramas indica una clase fenotípica F_2 diferente, de un extremo (izquierdo) al otro (derecho). Cada fenotipo es el resultado de un número diferente de alelos aditivos.

Alelos aditivos: las bases de la variación continua

La hipótesis de los factores múltiples engloba los siguientes puntos principales.

1. Los caracteres fenotípicos que muestran variación continua se pueden cuantificar, midiendo, pesando, contando, etc.
2. A menudo, dos o más pares de genes, repartidos por el genoma, explican la influencia hereditaria sobre el fenotipo de un *modo aditivo*. Debido a que pueden intervenir muchos genes, la herencia de este tipo se denomina a menudo *poligénica*.
3. Cada locus puede estar ocupado bien por un alelo aditivo, que contribuye con una cantidad dada al fenotipo, o por un alelo no aditivo, que no contribuye cuantitativamente al fenotipo.
4. La contribución de cada alelo aditivo al fenotipo, aunque pequeña, es aproximadamente equivalente.
5. Juntos, los alelos aditivos que contribuyen a un carácter cuantitativo, dan lugar a una variación fenotípica sustancial.

Cálculo del número de poligenes

Para estimar el número de poligenes que contribuyen a un carácter cuantitativo se han desarrollado varias fórmulas. Por ejemplo, si se puede determinar la proporción de individuos en F_2 que se parece a *cualquiera* de los dos fenotipos P_1 extremos, el número de pares de genes implicados se puede calcular como sigue:

$1/4^n$ = proporción de individuos F_2 que expresan cualquiera de los fenotipos extremos

En el ejemplo del color del grano de trigo rojo y blanco resumido en la Figura 24.2, 1/16 de la descendencia es o bien roja o bien blanca, como los fenotipos P_1. Esta proporción se puede sustituir en el lado derecho de la ecuación para calcular n:

$$\frac{1}{4^n} = \frac{1}{16}$$

$$\frac{1}{4^2} = \frac{1}{16}$$

$$n = 2$$

En la Tabla 24.1 se da la lista de proporciones y del número de clases fenotípicas F_2 producidas en cruces en los que están implicados cinco pares de genes.

Para un número de pares de genes bajo, a veces es más fácil utilizar la regla $(2n + 1)$. Si n es igual al número de loci aditivos implicados en el carácter, entonces $2n + 1$ determinará el número total de fenotipos posibles. Por ejemplo, si $n = 2$, $2n + 1 = 5$, ya que cada fenotipo es el resultado de 4, 3, 2, 1 ó 0 alelos aditivos. Si $n = 3$, $2n + 1 = 7$, ya que cada fenotipo es el resultado de 6, 5, 4, 3, 2, 1 ó 0 alelos aditivos.

Sin embargo, hay que advertir que estos sencillos métodos para estimar el número de poligenes implicados en un carácter cuantitativo suponen que todos los alelos relevantes contribuyen igual y aditivamente y también que la expresión fenotípica en F_2 no está afectada significativamente por factores ambientales. Como veremos más tarde, estas suposiciones pueden no ser ciertas para muchos caracteres cuantitativos.

TABLA 24.1 **DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE POLIGENES (n) IMPLICADOS EN UN CARÁCTER CUANTITATIVO**

n	Individuos que expresan cualquier fenotipo extremo	Clases fenotípicas distintas
1	1/4	3
2	1/16	5
3	1/64	7
4	1/256	9
5	1/1024	11

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se puede determinar el número de poligenes implicados en una carácter cuantitativo?

Ahora resuelva esto

El Problema 24.3 de la Página 719 da los rangos de F_1 y F_2 para un carácter cuantitativo y le pide que calcule el número de poligenes implicados.

Sugerencia: Recuerde que la proporción (no el número) de fenotipos paternos que reaparece en F_2 es la clave.

24.3 El estudio de los caracteres poligénicos depende del análisis estadístico

Uno de los retos más importantes con el que se enfrentan los investigadores en genética de caracteres cuantitativos es determinar cuánta de la variación fenotípica observada en una población se debe a las diferencias genéticas entre los individuos y cuanto a los factores ambientales. En la siguiente sección se discute con mayor detalle la partición de la varianza, pero primero necesitamos considerar las herramientas estadísticas básicas utilizadas en los datos derivados en la medición de la variación fenotípica cuantitativa. Normalmente no es factible medir la expresión de un carácter poligénico en cada uno de los individuos de una población, por lo que normalmente para medir se selecciona un grupo de individuos al azar que proporciona una **muestra**. Es importante recordar que la exactitud de la información obtenida depende de si la muestra está tomada realmente al azar y es representativa de la población. Por ejemplo, supongamos que un estudiante desea determinar la estatura media de 100 estudiantes de su clase y para su muestra mide a los dos estudiantes que se sientan cerca de él, perteneciendo los dos al equipo de baloncesto del colegio. Es improbable que esta muestra proporcione una buena estima de la estatura media de la clase por dos razones: primero, es demasiado pequeña; segundo, no es un subgrupo representativo de la clase (a menos de que los 100 estudiantes pertenezcan al equipo de baloncesto).

Si la muestra medida para la expresión del carácter cuantitativo es suficientemente grande y representativa de la población de la que se ha tomado, a menudo encontramos que los datos forman una **distribución normal** con una característica curva en campana cuando se representa como un histograma de frecuencias (Figura 24.4). En el análisis de caracteres que presentan una distribución normal son útiles varios métodos estadísticos, como la media, la varianza, la desviación típica, el error típico de la media y la covarianza.

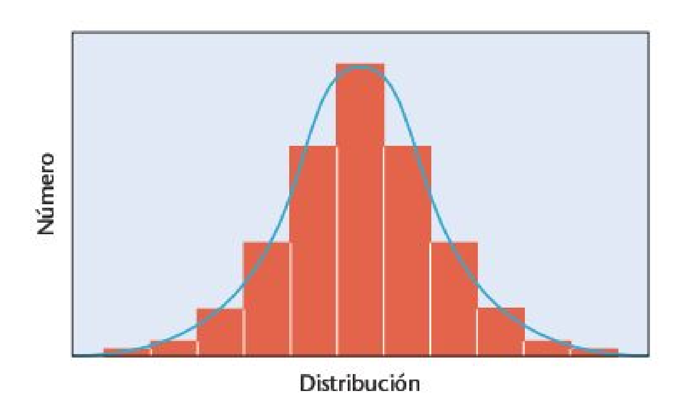


FIGURA 24.4 Distribución de frecuencias normal, que se caracteriza por una curva en campana.

La media

La media proporciona información sobre donde se sitúa el punto central a lo largo del rango de medidas de un carácter cuantitativo. En la Figura 24.5 podemos ver que las distribuciones de dos grupos de medidas fenotípicas representadas se agrupan alrededor de un valor central. Esta agrupación se llama **tendencia central** y el punto central es la **media** $\overline{X}$.

La media es el promedio aritmético de una serie de medidas y se calcula

$$\overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n}$$

en donde $\overline{X}$ es la media, ΣX_i representa la suma de todos los valores individuales de la muestra, y n el número de valores individuales.

La media proporciona un resumen descriptivo útil de la muestra, aunque no nos dice nada acerca del rango o amplitud de los datos. Como se ilustra en la Figura 24.5, una distribución simétrica de valores de una muestra puede, en un caso, agruparse cerca de la media. O, un grupo de medidas puede tener la misma media, pero distribuidos más ampliamente a su alrededor. Un segundo estadístico, la varianza, proporciona información sobre la dispersión de los datos alrededor de la media.

Varianza

La varianza de una muestra es la distancia promedio al cuadrado de todas las medidas respecto de la media. Se calcula

$$s^2 = \frac{\Sigma (X_i - \overline{X})^2}{n - 1}$$

en donde la suma (Σ) de los cuadrados de las diferencias entre cada valor (X_i) y la media ($\overline{X}$) se divide por el tamaño total de la muestra menos uno ($n - 1$).

Como muestra la Figura 24.5 es posible que dos muestras de un carácter cuantitativo tengan la misma media pero varianzas diferentes. La estima de la varianza puede ser útil para determinar el grado de control genético de caracteres cuando el ambiente inmediato también influye en el fenotipo.

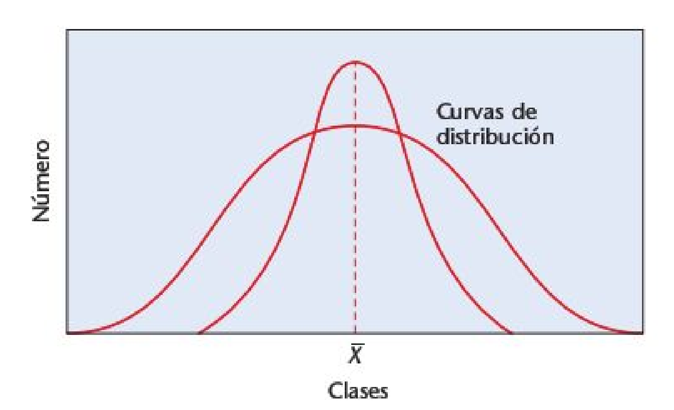


FIGURA 24.5 Dos distribuciones de frecuencias normales con la misma media pero con diferentes cantidades de variación.

Desviación típica

Debido a que la varianza es un valor elevado al cuadrado, sus unidades de medida están también elevadas al cuadrado (m^2, g^2, etc.). Para expresar la variación alrededor de la media en las unidades originales de medida, podemos utilizar la raíz cuadrada de la varianza, un término denominado **desviación típica** (s):

$$s = \sqrt{s^2}$$

La Tabla 24.2 muestra el porcentaje de los valores individuales en una distribución normal que caen dentro de múltiplos diferentes de la desviación típica. Una desviación típica a ambos lados de la media abarca al 68 por ciento de todos los valores de la muestra. Alrededor del 95 por ciento de todos los valores se encuentran dentro de dos desviaciones típicas a ambos lados de la media. Esto significa que la desviación típica s también se puede interpretar como una probabilidad. Por ejemplo, una medida de la muestra tomada al azar tiene una probabilidad del 68 por ciento de caer dentro del rango de una desviación típica a ambos lados de la media.

Error típico de la media

Si se toman muchas muestras de una población y se miden para el mismo carácter cuantitativo, podemos encontrar que sus medias varíen. Teóricamente, muestras grandes tomadas realmente al azar representarán a la población más exactamente y sus medias estarán más próximas entre si. Para medir la exactitud de la media de la muestra utilizamos el **error típico de la media** ($S_{\overline{X}}$), que se calcula

$$S_{\overline{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

en donde s es la desviación típica, y $\sqrt{n}$ es la raíz cuadrado del tamaño de la muestra. Debido a que el error típico de la media se calcula dividiendo s por $\sqrt{n}$, siempre es un valor más pequeño que la desviación típica.

Covarianza

A menudo los genéticos que trabajan en caracteres cuantitativos tienen que considerar dos caracteres fenotípicos simultáneamente. Por ejemplo, un criador de gallinas podría calcular la **covarianza** entre el peso del cuerpo y la producción de hue-

TABLA 24.2 MUESTRAS INCLUIDAS PARA DISTINTOS VALORES DE *s*

Multiplos de s	Muestras incluidas (%)
$\overline{X} \pm 1s$	68,3
$\overline{X} \pm 1{,}96s$	95,0
$\overline{X} \pm 2s$	95,5
$\overline{X} \pm 3s$	99,7

vos en las gallinas: aves más gruesas tenderían a poner más huevos. La covarianza mide cuanta variación es común para ambos caracteres cuantitativos. Se calcula tomando las desviaciones de cada carácter respecto de la media (como se hizo para estimar la varianza) para cada individuo de la muestra. Esto da un par de valores que se multiplican; la suma de todos estos productos se divide por el número de individuos de la muestra menos uno. Así la covarianza **cov**$_{xy}$ de dos grupos de medidas x e y de un carácter se calcula

$$\mathrm{cov}_{XY} = \frac{\Sigma[(X_i - \overline{X})(Y_i - \overline{Y})]}{n - 1}$$

La covarianza se puede normalizar con otro estadístico, el **coeficiente de correlación (*r*)**. El cálculo es

$$r = \mathrm{cov}_{XY}/S_{\overline{X}}S_{\overline{Y}}$$

en donde S_x es la desviación típica del primer grupo de medidas cuantitativas x y S_y la desviación típica del segundo grupo de medidas y. Los valores del coeficiente de correlación r van de -1 a $+1$. Valores positivos significan que un aumento en la medida de un carácter tiende a estar asociado con un aumento en la medida del otro carácter. Por consiguiente, si las gallinas con más peso tienden a poner más huevos, se esperaría un valor de r positivo. Por otro lado, un valor negativo de r sugiere que la mayor producción de huevos se produzca más probablemente por las gallinas con menos peso. Hay que advertir un punto importante en el coeficiente de correlación; incluso valores altos de r no implican que haya una relación de causa-efecto entre los dos caracteres. La correlación simplemente nos dice el grado en el que la variación de un carácter cuantitativo está asociada con la variación del otro, no que cause dicha variación.

Ahora resuelva esto

El Problema 24.15 de la página 720 da datos sobre caracteres cuantitativos de un rebaño de ovejas. ¿Están los caracteres correlacionados?

Sugerencia: Calcule primero la desviación típica para cada carácter y luego la covarianza.

Análisis de un carácter cuantitativo

Una variedad de tomate homozigota produce tomates con un peso medio de 18 onzas[1], mientras que el fruto de otra variedad diferente homozigota tiene un peso medio de 6 onzas. Se cruzan estas dos variedades que dan lugar a una F_1 con pesos de 10 a 14 onzas. La F_2 presenta individuos que producen frutos de 6 a 18 onzas. En la Tabla 24.3 se muestran los resultados que caracterizan a ambas generaciones.

El valor medio del peso del fruto en F_1 se calcula como:

$$\overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{626}{52} = 12{,}04$$

De igual manera, el valor medio del peso del fruto en F_2 se calcula como

$$\overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{872}{72} = 12{,}11$$

Aunque estos valores medios son similares, la distribución de frecuencias en la Tabla 24.3 presenta más variación en F_2. Esta variación se puede cuantificar como la varianza de la muestra s^2, calculada como la suma del cuadrado de las diferencias entre cada valor y el valor medio, dividida por el número total de observaciones menos 1. Así

$$s^2 = \frac{\Sigma(X_i - \overline{X})^2}{n - 1}$$

La varianza es 1,29 para la F_1 y 4,28 para la F_2. Cuando se convierten a las desviaciones típicas $\left(s = \sqrt{s^2}\right)$, los valores quedan en 1,13 y 2,06, respectivamente. Así se puede describir la distribución del peso del tomate en F_1 como $12{,}04 \pm 1{,}13$, y en F_2 como $12{,}11 \pm 2{,}06$.

Asumiendo que ambas variedades de tomate son homozigotas para los loci relevantes y que los alelos que controlan el peso del fruto actúan aditivamente, podemos estimar el número de poligenes implicados en este carácter. Ya que 1/72 de los descendientes de F_2 tienen un fenotipo que solapa con una de las variedades paternas (de los 72 descendientes en F_2, uno pesa 6 onzas y otro 18 onzas; véase la Tabla 24.3), el uso de la fórmula $1/4^n = 1/72$ nos indica que n se encuentra entre 3 y 4, que es una estima del número de genes que controlan el peso del fruto en estas variedades de tomate.

TABLA 24.3 DISTRIBUCIÓN DE LA DESCENDENCIA DE F_1 Y F_2

		Peso (en onzas)												
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Número de	F_1:					4	14	16	12	6				
individuos	F_2:	1	1	2	0	9	13	17	14	7	4	3	0	1

[1] *Nota del traductor:* una onza es aproximadamente 28 gramos.

24.4 La heredabilidad estima la contribución genética en la variabilidad fenotípica

La cuestión que se preguntan más a menudo los genéticos que trabajan con caracteres multifactoriales es cuánto de la variación fenotípica observada en una población se debe a las diferencias genéticas entre los individuos y cuánto se debe al ambiente. El término **heredabilidad** se utiliza para describir la proporción de la variación fenotípica total de una población que se debe a factores genéticos. Para un carácter multifactorial de una población dada, una estima de heredabilidad alta indica que gran parte de la variación se puede atribuir a factores genéticos, teniendo el ambiente menos impacto en la expresión del carácter. Con una estima de heredabilidad baja, es probable que los factores ambientales tengan un mayor impacto sobre la variación fenotípica en la población.

El concepto de heredabilidad es frecuentemente mal entendido y mal utilizado. Debería subrayarse que la heredabilidad no indica cuanto de un carácter está determinado genéticamente, o la proporción en la que el fenotipo de un individuo se debe al genotipo. En años recientes tal interpretación errónea de la heredabilidad para caracteres cuantitativos humanos ha dado lugar a controversias, especialmente en relación con la medida del «coeficiente de inteligencia» IQ. La variación en las estimas de la heredabilidad para el IQ entre los diferentes grupos raciales comprobados condujo a sugerencias incorrectas de que factores genéticos inalterables controlan las diferencias en los niveles de inteligencia entre las razas humanas. Tales sugerencias tergiversan el significado de la heredabilidad e ignoran la contribución de la interacción genotipo-ambiente en la variación fenotípica de la población. Además, la heredabilidad no es un carácter fijo. Por ejemplo, una estima de la heredabilidad de la producción de huevos en un averío de gallinas que se mantiene en jaulas podría ser alta, indicando que las diferencias en la producción de huevos entre las aves son en gran parte debidas a diferencias genéticas ya que todas ellas tienen un ambiente muy similar. Para un averío distinto mantenido en el exterior, la heredabilidad en la producción de huevos podría ser mucho menor, ya que la variación entre las diferentes gallinas puede también reflejar diferencias en sus ambientes. Tales diferencias podrían incluir cuánto alimento se procura cada gallina y si compite con éxito por un buen lugar para descansar por la noche. Así, una estima de la heredabilidad nos indica la proporción de variación fenotípica que se puede atribuir a la variación genética *dentro de una población dada en un ambiente particular*. Si medimos la heredabilidad del mismo carácter en poblaciones distintas en una serie de ambientes, normalmente encontraremos que los valores de la heredabilidad calculada tienen grandes errores típicos. Este es un punto importante que recordar cuando consideremos las estimas de la heredabilidad para caracteres en poblaciones humanas. Una estima media de la heredabilidad de 0,65 para la estatura humana no significa que su estatura sea debida a sus genes en un 65 por ciento, sino más bien que en las poblaciones muestreadas, como promedio, el 65 por ciento de toda la variación en estatura puede explicarse por diferencias genéticas entre individuos.

Con esta sutil, pero importante distinción en mente, consideraremos como dividen los genéticos la variación fenotípica observada en una población en los componentes genético y ambiental. Como vimos en la sección anterior, esta variación se puede cuantificar como una varianza de la muestra: tomando las medidas del carácter en cuestión de una muestra representativa de la población y determinando el grado de dispersión de dichas medidas alrededor de la media de la muestra. Esto nos da una estima de la varianza fenotípica total de la población (V_P; del inglés: *Phenotypic Variance*). Las estimas de heredabilidad se obtienen utilizando diferentes técnicas experimentales y estadísticas para partir la V_P en la **varianza genética** (V_G) y la **varianza ambiental** (V_E; del inglés: *Environmental Variance*).

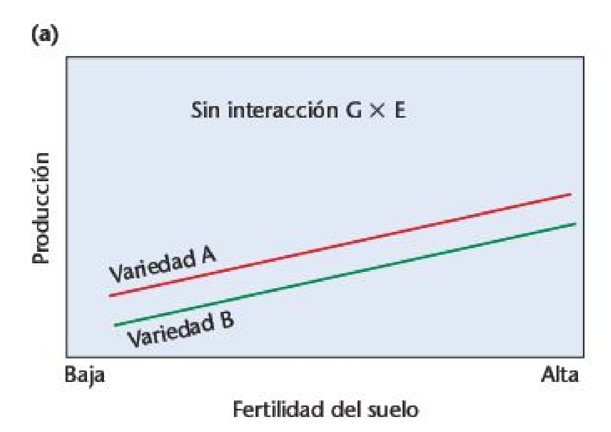
Un tercer factor que contribuye a los niveles totales de variación fenotípica es el grado en el que los genotipos individuales afectan de manera diferente al fenotipo en ambientes diferentes. Por ejemplo, la variedad de trigo A puede producir un promedio de 20 bushels[2] por acre en suelo pobre, mientras que la variedad B produce un promedio de 17 bushels. En un buen suelo, la variedad A produce 22 bushels, mientras que la variedad B produce un promedio de 25 bushels por acre. Hay diferencias en la producción entre las dos variedades genotípicamente distintas, por lo que la variación en la producción de trigo tiene un componente genético. Ambas variedades producen más en un buen suelo, por lo que la producción está afectada por el ambiente. Sin embargo, también vemos que las dos variedades no responden de la misma manera en las condiciones de buen suelo: El genotipo de la variedad de trigo B logra un mayor incremento en la producción en el suelo bueno que la variedad A. Así, tenemos diferencias en la interacción del genotipo con el ambiente que contribuyen a la variación en la producción en las poblaciones de trigo. Este tercer componente de variación fenotípica es la **varianza de la interacción genotipo-ambiente** ($V_{G \times E}$) (Figura 24.6).

Podemos ahora resumir todos los componentes de la varianza fenotípica total V_P utilizando la siguiente ecuación:

$$V_P = V_G + V_E + V_{G \times E}$$

En otras palabras, la varianza fenotípica total se puede subdividir en varianza genética, varianza ambiental y varianza de la interacción genotipo-ambiente. Cuando se obtienen estimas de la heredabilidad para un carácter multifactorial, los investigadores suponen a menudo que la varianza de la interacción genotipo-ambiente es lo bastante pequeña como para ignorarla o considerarla junto con la varianza ambiental. Sin embargo, es bueno recordar que este tipo de aproximación es otra de las ra-

[2] *Nota del traductor:* 1 bushel = 35 litros para áridos.



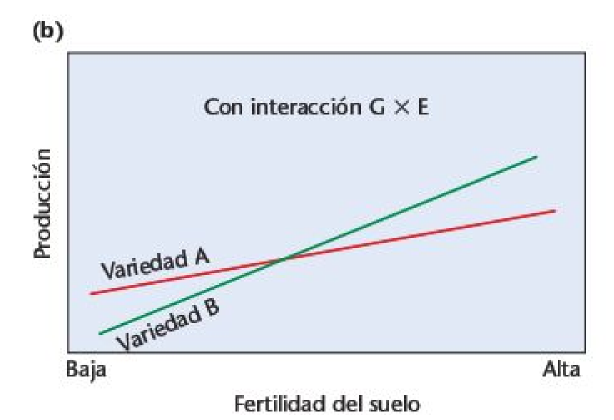


FIGURA 24.6 Diferencias en producción entre dos variedades de trigo en suelos con diferentes niveles de fertilidad. (a) Sin interacciones G × E: Las variedades muestran diferencias genéticas en la producción, pero responden de la misma manera al incrementarse la fertilidad del suelo. (b) Con interacción G × E: La variedad A supera en producción a la variedad B en suelos poco fértiles, pero la variedad B produce más que la A cuando los niveles de fertilidad aumentan.

zones por las que los valores de heredabilidad son estimaciones de una población dada, no un atributo fijo del carácter.

Los mejoradores de animales y vegetales utilizan una serie de técnicas experimentales para estimar las heredabilidades mediante la partición de las medidas de varianza fenotípica en componentes genético y ambiental. Un planteamiento es utilizar cepas consanguíneas que tengan individuos genéticamente homogéneos, con un elevado porcentaje de individuos homozigotos. Entonces se diseñan experimentos para comprobar los efectos de una serie de condiciones ambientales sobre la variabilidad fenotípica. La variación *entre* diferentes cepas consanguíneas cultivadas en un ambiente constante se debe predominantemente a factores genéticos. La variación *entre* miembros de la misma cepa consanguínea cultivados en condiciones distintas es más probable que se deba a factores ambientales. Otro planteamiento implica el análisis de la varianza de un carácter cuantitativo entre los descendientes de cruces distintos o comparando la expresión de un carácter entre descendientes y padres cultivados en el mismo ambiente. Más detalles de estas técnicas experimentales se pueden encontrar en algunas de las «Lecturas seleccionadas» al final de este capítulo.

La heredabilidad en sentido amplio

La heredabilidad en sentido amplio (representada por el término H^2) mide la contribución de la varianza genética a la varianza fenotípica total. Se estima como la proporción:

$$H^2 = \frac{V_G}{V_P}$$

Los valores de heredabilidad de un carácter en una población van de 0 a 1. Un valor próximo a 1 indica que las condiciones ambientales tienen poco impacto en la varianza fenotípica, que por consiguiente se debe en gran medida a las diferencias genéticas entre los individuos de la población. Los valores próximos a 0 indican que son los factores ambientales, no las diferencias genéticas, los responsables en gran medida de la variación fenotípica observada en la población estudiada. Muy pocos caracteres cuantitativos tienen estimas de heredabilidad muy altas o muy bajas, sugiriendo que tanto los genes como el ambiente juegan un papel en la expresión de muchos fenotipos del rango.

El componente de varianza genética V_G usado en las estimaciones de la heredabilidad en sentido amplio incluye todos los tipos de variación genética de la población: no distingue entre loci de caracteres cuantitativos con alelos que actúan aditivamente o de aquellos con efectos epistáticos o dominantes. La heredabilidad en sentido amplio también asume que el componente de varianza genotipo-ambiente es despreciable. Aunque las estimas de heredabilidad en sentido amplio para un carácter son de interés genético general, estas limitaciones hacen que este tipo heredabilidad no sea muy útil en programas de mejora. Los mejoradores de animales y vegetales que desean desarrollar cepas mejoradas de ganado o de variedades de vegetales de gran producción necesitan estimas de la heredabilidad más precisas de los caracteres que desean manipular en la población. Por consiguiente se ha diseñado otro tipo de estimación, la heredabilidad en sentido estricto, que es de uso más práctico.

La heredabilidad en sentido estricto

La heredabilidad en sentido estricto (h^2) es la proporción de varianza fenotípica debida exclusivamente a la varianza genética aditiva. La varianza genética se puede dividir en dos subcomponentes que representan los diferentes modos de acción de los alelos de los loci de un carácter cuantitativo. Como no todos los genes implicados en un carácter cuantitativo afectan al fenotipo de la misma manera, esta partición distingue entre diferentes tipos de acción génica que contribuye a la varianza genética. La **Varianza aditiva,** V_A, es la varianza genética que se debe a la acción aditiva de los alelos de los loci de un carácter cuantitativo. La **Varianza de la dominancia,** V_D, es la desviación de los componentes aditivos que resulta cuando la ex-

presión fenotípica de los heterozigotos no es precisamente intermedia entre los dos homozigotos. La **Varianza de la interacción**, V_I, es la desviación de los componentes aditivos que se produce cuando dos o más loci se comportan epistáticamente. El valor de la varianza de la interacción es a menudo despreciable, por lo que este componente se puede excluir de los cálculos de la varianza genética total.

La partición de la varianza genética total V_G se resume en la ecuación

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

y una estima de la heredabilidad en sentido estricto, basada sólo en la porción de varianza genética debida a la acción de genes aditivos, es

$$h^2 = \frac{V_A}{V_P}$$

Omitiendo V_I y separando V_P en sus componentes genético y ambiental obtenemos,

$$h^2 = \frac{V_A}{V_E + V_A + V_D}$$

Las estimas de la heredabilidad se utilizan en la mejora de animales y vegetales para indicar la respuesta potencial de una población a la selección artificial de un carácter cuantitativo. La heredabilidad en sentido estricto, h^2, proporciona una predicción más exacta de la respuesta a la selección que la heredabilidad en sentido amplio, H^2, y por ello los mejoradores utilizan más la h^2.

Ahora resuelva esto

El Problema 24.12 de la página 720 da datos de dos caracteres cuantitativos de una piara de cerdos y le pide que elija cual de los dos seleccionaría el granjero.

Sugerencia: Considere qué proporción de la varianza de los componentes es el mejor indicador de la respuesta potencial a la selección.

Selección artificial

La **selección artificial** es un proceso para escoger individuos específicos con los fenotipos preferidos a partir de una población inicialmente heterogénea con el propósito de mejora en el futuro. Teóricamente, si la selección artificial basada en las mismas preferencias del carácter se repite durante muchas generaciones, se puede desarrollar una población con una elevada frecuencia de individuos con las características deseadas. Si se selecciona un carácter simple controlado por uno o dos genes sujetos a poca influencia ambiental, es relativamente fácil y rápido generar la población deseada de animales o vegetales. Sin embargo, muchos caracteres de importancia económica en cosechas y ganadería, como producción de cereales, ganancia de peso o producción de leche en el ganado o velocidad y fuerza en los caballos, son poligénicos y frecuentemente multifactoriales. La selección artificial de tales caracteres es más lenta y compleja. Las estimaciones de la heredabilidad en sentido estricto son valiosas para mejoradores de vegetales y animales porque, como acabamos de ver, estima la proporción de la varianza fenotípica total del carácter que se debe a la varianza genética aditiva. Los alelos de los caracteres cuantitativos con acción aditiva son los que más fácilmente se manipulan por el mejorador. Los alelos de loci de caracteres cuantitativos que generan efectos dominantes o de interacción epistática (y por consiguiente contribuyen a la V_D o V_I) responden menos a la selección artificial. Así, la heredabilidad en sentido estricto, h^2, se puede utilizar para medir el impacto de la selección. A mayor valor de la estima de h^2 en una población, mayor será el cambio en el rango fenotípico del carácter que el mejorador verá en la generación siguiente.

La partición de los componentes de la varianza genética para calcular h^2 y predecir la respuesta a la selección es una tarea compleja que requiere un diseño experimental y un análisis cuidadoso. El planteamiento más simple es seleccionar individuos con los fenotipos mejores para el carácter cuantitativo deseado a partir de una población heterogénea y obtener descendientes de dichos individuos. Luego, los valores medios del carácter se pueden comparar con (1) la población original (M), (2) los individuos seleccionados utilizados como padres (M1) y (3) los descendientes que resultan del cruce entre los padres seleccionados (M2). Las relaciones entre estas tres medias y h^2 son

$$h^2 = \frac{M2 - M}{M1 - M}$$

Esta ecuación se puede simplificar más definiendo M2 − M como la **respuesta** (R) y M1 − M como el **diferencial de selección** (S), por lo que h^2 refleja la proporción de la respuesta observada respecto de la respuesta total posible. Así,

$$h^2 = \frac{R}{S}$$

Un valor de la heredabilidad en sentido estricto obtenido de esta manera mediante cruces selectivos y midiendo la respuesta en los descendientes es una estima de la **heredabilidad realizada**.

Como ejemplo de una estima de heredabilidad realizada, supongamos que medimos el diámetro de los granos de maíz de una población en donde el diámetro medio M era de 20 mm. De esta población seleccionamos un grupo con los diámetros más pequeños, los cuales tienen una media M1 igual a 10mm. Las plantas seleccionadas se cruzan y el diámetro medio de los granos de la descendencia M2 es de 13mm. Podemos calcular la heredabilidad realizada h^2 para estimar el potencial de la selección artificial sobre el tamaño de grano:

$$h^2 = \frac{M2 - M}{M1 - M}$$

$$h^2 = \frac{13 - 20}{10 - 20}$$

$$= \frac{-7}{-10}$$

$$= 0{,}70$$

Este valor de la heredabilidad en sentido estricto indica que el potencial selectivo para el tamaño del grano es relativamente alto.

El experimento de selección artificial más largo conocido, todavía se está llevando a cabo en el State Agricultural Laboratory de Illinois. Desde 1896, se ha seleccionado el maíz para alto y bajo contenido de aceite. Después de 76 generaciones, la selección continúa incrementando el contenido en aceite (Figura 24.7). En cada ciclo de selección, muchas de las plantas de maíz acumulaban un mayor porcentaje de alelos aditivos implicados en la producción de aceite. Por ello, la heredabilidad en sentido estricto h^2 del aumento del contenido en aceite en generaciones sucesivas fue declinando (véanse los valores entre paréntesis en las generaciones 9, 27, 52 y 74 de la Figura 24.7) a medida que la selección artificial se aproximaba cada vez más al potencial genético óptimo para la producción de aceite. Teóricamente el proceso continuará hasta que todos los individuos de la población posean un genotipo uniforme que incluya a todos los alelos aditivos responsables del mayor contenido en aceite. En dicho punto, h^2 se reducirá a cero y la respuesta a la selección artificial cesará. La disminución de la respuesta a la selección por bajo contenido de aceite muestra que la heredabilidad para el carácter se está aproximando a dicho punto.

En la Tabla 24.4 se da una lista de las estimaciones de la heredabilidad en sentido estricto, expresadas en porcentajes, de una serie de caracteres cuantitativos en distintos organismos. Como se puede ver, estos valores de h^2 varían, pero la heredabilidad tiende a ser baja en caracteres cuantitativos que son esenciales para la supervivencia del organismo. Recuerde que esto no quiere decir que no haya contribución genética a los fenotipos observados para tales caracteres. El valor bajo de h^2 demuestra que la selección natural ya ha optimizado en gran medida el componente genético de estos caracteres a lo largo

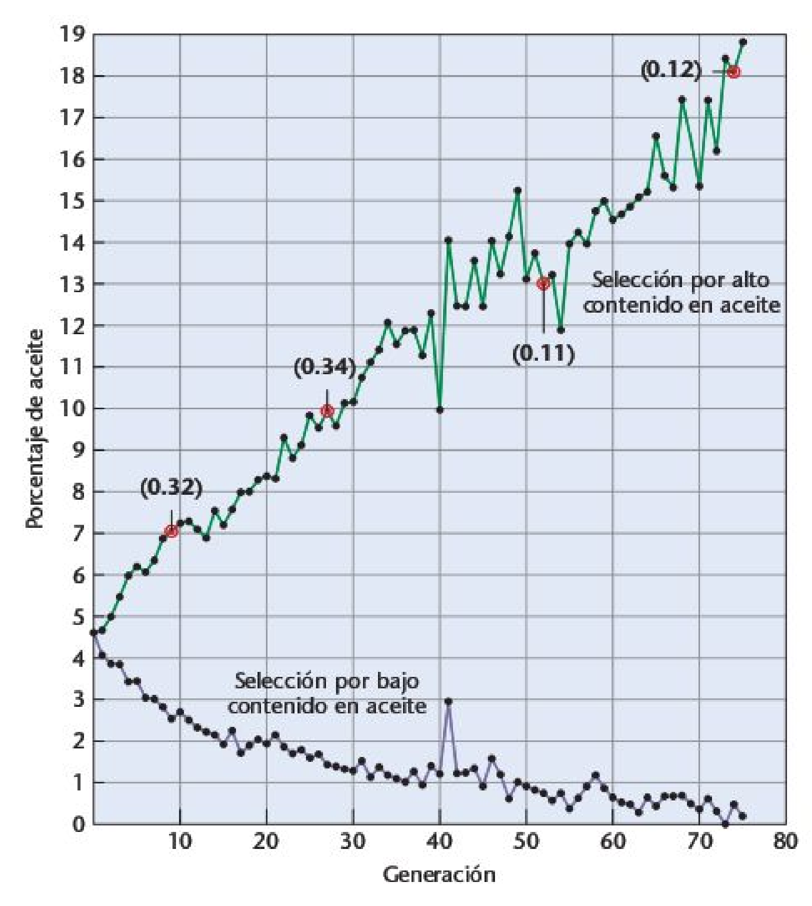


FIGURA 24.7 Respuesta del maíz a la selección por alto y bajo contenido en aceite durante 76 generaciones. El número entre paréntesis en las generaciones 9, 27, 52 y 74 de la línea para «alto contenido en aceite» indican el cálculo de la heredadibilidad en dichos puntos en el experimento continuo.

TABLA 24.4 ESTIMACIONES DE LA HEREDABILIDAD PARA CARACTERES DE DIVERSOS ORGANISMOS

Carácter	Heredabilidad (h^2)
Ratón	
Longitud de la cola	60%
Peso del cuerpo	37
Tamaño de la camada	15
Gallinas	
Peso corporal	50
Producción de huevos	20
Eclosión de los huevos	15
Ganado vacuno	
Peso al nacer	45
Producción de leche	44
Tasa de concepción	3

de la evolución. La producción de huevos, el tamaño de la camada y la tasa de concepción son ejemplos en donde ya se han establecido tales limitaciones fisiológicas sobre la selección. Los caracteres que son menos esenciales para la supervivencia, como el peso del cuerpo, la longitud de la cola y la longitud del ala, tienen heredabilidades más altas, ya que en la población todavía hay mucha variación genética para dichos caracteres. Recuerde también que cualquier estimación de la heredabilidad proporciona información solo de una población en un ambiente específico. Por consiguiente, las estimaciones de la heredabilidad en sentido estricto son más valiosas como pronóstico de la respuesta a la selección cuando se basan en datos recogidos en muchas poblaciones y ambientes y en donde se establece una tendencia clara.

24.5 Los estudios sobre gemelos permiten estimar la heredabilidad en la especie humana

Por razones obvias, en la especie humana no son posibles los estudios tradicionales de la heredabilidad. Sin embargo, los gemelos pueden ser muy útiles para examinar en un carácter multifactorial cuanta varianza es genética y cuanta ambiental. Los **gemelos monozigotos** (MZ) o **idénticos**, que provienen de la división y separación de un óvulo después de la fecundación, son idénticos genéticamente. Los **gemelos dizigotos (DZ)** o **fraternos**, por otro lado, se originan de dos fecundaciones distintas y son tan similares genéticamente como dos hermanos cualesquiera, con alrededor del 50 por ciento de sus genes en común. Por consiguiente, para un carácter dado, las diferencias fenotípicas entre pares de gemelos idénticos es equivalente a la varianza ambiental V_e (ya que la varianza genética es cero). Sin embargo, las diferencias fenotípicas entre gemelos dizigotos representan tanto la varianza ambiental V_e como aproximadamente la mitad de la varianza genética V_g. La comparación de la varianza fenotípica para el mismo carácter en grupos de gemelos monozigotos y dizigotos proporciona una estima de la heredabilidad en sentido amplio del carácter.

Otro planteamiento utilizado en estudio de gemelos ha sido comparar parejas de gemelos idénticos criados juntos con parejas que fueron separadas y criadas en lugares diferentes. Para cualquier carácter dado, se pueden investigar las semejanzas o diferencias promedio. Se dice que los gemelos son **concordantes** para un carácter dado si ambos lo expresan *o* ninguno de ellos lo hace. Si uno expresa el carácter *y* el otro no, se dice que el par es **discordante.** La comparación de los valores de concordancia de gemelos MZ respecto de DZ criados juntos ilustra el valor potencial de la estima de la heredabilidad. (Véase «Ahora resuelva esto» más abajo.)

Tales datos se tienen que examinar muy cuidadosamente antes de deducir cualquier conclusión. Si el valor de concordancia se aproxima al 90 ó 100 por ciento en los gemelos monozigotos, podríamos inclinarnos a interpretar este valor como indicación de una gran contribución genética a la expresión del carácter. En algunos casos —por ejemplo, grupos sanguíneos y color de los ojos— sabemos que esto es realmente así. Sin embargo, en el caso del sarampión, un alto valor de concordancia simplemente indica que el carácter está casi siempre inducido por un factor ambiental —en este caso un virus.

Es más significativo comparar las *diferencias* entre los valores de concordancia en gemelos monozigotos y dizigotos. Si estos valores son significativamente más altos para los gemelos monozigotos que para los dizigotos, sospechamos que hay un componente genético implicado en la determinación del carácter. Alcanzamos esta conclusión porque en los gemelos monozigotos, con genotipos idénticos, esperaríamos que se presentara una mayor concordancia que en los gemelos dizigotos, genéticamente relacionados, pero no genéticamente idénticos. En el caso del sarampión, en donde la concordancia es alta en ambos tipos de gemelos, se supone que el ambiente contribuye significativamente. Tal análisis es útil porque las características fenotípicas que permanecen similares en ambientes distintos es probable que tengan un marcado componente genético.

Los estudios de gemelos humanos, aunque muy interesantes, tienen algunas fuentes de error inevitables. Por ejemplo, a menudo los gemelos idénticos son tratados de manera más similar por los padres y maestros que los gemelos no idénticos, especialmente cuando la pareja de gemelos no idénticos son de sexos distintos. Esto puede hinchar la varianza ambiental para las parejas de gemelos no idénticos. Otra posible fuente de error es la interacción genotipo-ambiente, que puede aumentar la varianza fenotípica total en los gemelos no idénticos cuando se compara con los gemelos idénticos criados en el mismo ambiente. Por consiguiente, las estimas de heredabilidad para caracteres humanos basadas en el estudio de gemelos deberían considerarse como aproximaciones y examinarse muy cuidadosamente antes de sacar cualquier conclusión.

Ahora resuelva esto

El Problema 24.24 de la página 722 da una lista de los porcentajes de gemelos monozigotos (MZ) y dizigotos (DZ) que en distintos caracteres expresan el mismo fenotipo y se le pide que evalúe la importancia relativa de los factores genético y ambiental.

Sugerencia: Considere como difieren genéticamente los gemelos MZ de los DZ. Si cada pareja de gemelos se crió en el mismo ambiente, considere cómo podría afectar esto a la expresión de fenotipos determinados genéticamente respecto de los determinados ambientalmente.

24.6 Los loci de los caracteres cuantitativos se pueden cartografiar

El tipo de análisis de genealogías que consideramos al principio del texto (véanse los Capítulos 3 y 4) son poco útiles para identificar los genes múltiples implicados en los caracteres cuantitativos. Los efectos ambientales, la interacción entre los alelos que segregan y el número de genes que contribuye a un fenotipo poligénico hacen difícil aislar el efecto de cualquier gen individual. Sin embargo, ya que muchos caracteres cuantitativos tienen importancia económica o médica, es útil identificar los genes implicados y determinar su localización en el genoma. Los genes múltiples que contribuyen a un carácter cuantitativo se conocen como **loci de caracteres cuantitativos (QTL)**. La identificación de estos loci proporciona información de cuantos genes están implicados en un caracteres cuantitativo y si todos contribuyen de la misma manera o algunos genes influyen más que otros. La cartografía revela si los QTL asociados a un carácter están agrupados en un único cromosoma o dispersos por todo el genoma.

Para encontrar y cartografiar los QTL, los investigadores buscan la asociación entre secuencias de DNA particulares del genoma y fenotipos que caen dentro de un cierto rango del fenotipo cuantitativo. Un modo de hacer esto es cruzar líneas consanguíneas homozigotas que tiene diferentes fenotipos extremos para el carácter de interés para dar lugar a una F_1 compuesta por heterozigotos para la mayoría de los loci que contribuyen al carácter. Cruces adicionales, bien entre individuos F_1 o entre la F_1 y las líneas consanguíneas paternas, da lugar a una generación F_2 con un alto grado de segregación para diferentes genotipos QTL y fenotipos asociados. Esta segregación en F_2 se conoce como la **cartografía poblacional de QTL**. Los investigadores miden la expresión del carácter en cada individuo de la población cartografiada e identifican distintos genotipos utilizando marcadores de DNA, como RFLP y microsatélites. (Véase el Capítulo 22 para una descripción más detallada de la tecnología de marcaje.) Entonces se utilizan análisis estadísticos con ayuda de ordenador para examinar las correlaciones entre los marcadores y la variación fenotípica del carácter. Si un marcador de DNA no está ligado a un QTL, entonces la media fenotípica del carácter no variará entre individuos con genotipos diferentes en dicho locus marcador. Sin embargo, si un marcador de DNA está ligado a un QTL, entonces los genotipos que difieren en dicho locus marcador también diferirán en la expresión del carácter. Cuando esto ocurre, se dice que el locus marcador y el QTL *cosegregan*. Una cosegregación consistente establece la presencia de un QTL junto o cerca del marcador de DNA a lo largo del cromosoma: El marcador y el QTL están ligados. Cuando se han localizado numerosos QTL para un carácter dado, se puede construir un mapa genético con la posición de los genes implicados en cromosomas distintos.

Se dispone ahora de marcadores de DNA en muchos organismos de importancia agrícola, haciendo posible una cartografía sistemática de los QTL. Por ejemplo, en el tomate se han localizado cientos de marcadores de RFLP. El análisis de QTL se realiza cruzando plantas con fenotipos extremos, pero opuestos, y siguiendo los cruces durante varias generaciones. Se han identificado muchos loci que son responsables de caracteres cuantitativos, como el tamaño del fruto, la forma, el contenido sólido soluble y la acidez. Estos loci se distribuyen entre los 12 cromosomas que representan el genoma haploide de esta planta. Varios cromosomas tienen loci para caracteres múltiples.

La cartografía y caracterización de los QTL en el tomate ha sido el foco de un esfuerzo investigador con mucho éxito conducido por Steven Tanksley y sus colegas de la Cornell University. Su investigación demuestra que aproximadamente 30 QTL contribuyen a la forma y el tamaño del fruto en el tomate. Sin embargo, estos QTL no tienen los mismos efectos: 10 genes repartidos en 7 cromosomas explican la mayoría de la variación fenotípica observada en estos caracteres. Alelos diferentes en uno de estos loci, el *fw2.2* en el cromosoma 2, pueden cambiar el tamaño del fruto hasta en un 30 por ciento. El *fw2.2* se ha aislado, clonado y transferido a otras plantas con interesantes resultados. Mientras que el tomate cultivado puede pesar hasta 1.000 gramos, el fruto de especies silvestres relacionadas, que se cree son progenitoras del tomate actual, pesan unos pocos gramos. Dos alelos distintos del *fw2.2*, identificados como consecuencia de los estudios de cartografía con RFLP, parece que han jugado un papel muy importante en el desarrollo del tomate cultivado. Un alelo se encuentra en todas las variedades silvestres de tomate de fruto pequeño investigadas. Cuando el alelo *fw2.2*, clonado de las variedades de fruto pequeño, se transfiere a plantas que normalmente producen tomates grandes, la planta transformada produce frutos que tienen un peso reducido (Figura 24.8). En las variedades estudiadas por el grupo de Tanksley, la reducción media es de 17 gramos, un cambio fenotípico significativo ocasionado por la acción de un solo QTL. Análisis posterior del *fw2.2* revelaron que el alelo de fruto grande de este locus codifica para una

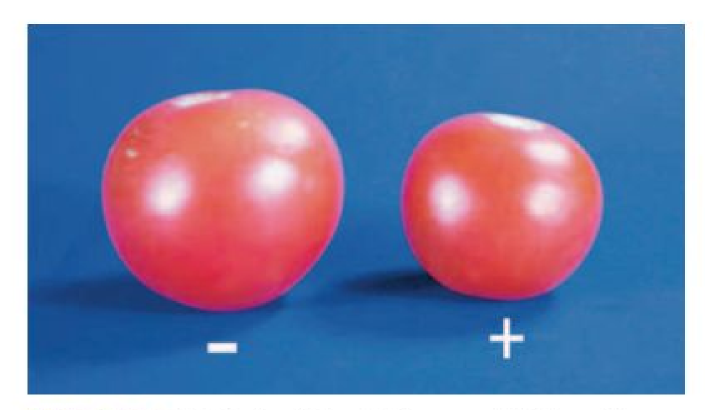


FIGURA 24.8 Efecto fenotípico del transgen *fw2.2* en el tomate. Cuando el alelo que da lugar a fruto pequeño se transfiere a una planta que normalmente produce fruto grande, el fruto se reduce de tamaño (+). Se muestra un fruto control (−), que normalmente es más grande, para comparar.

proteína que actúa como un represor negativo de la división celular, dando lugar a un incremento de la mitosis en el tejido cortical que forma el fruto. El alelo *fw2.2* de fruto pequeño codifica a la misma proteína, pero con una mutación en la región promotora que reduce los niveles de transcripción, dando lugar a un menor ritmo de divisiones celulares y a frutos más pequeños.

La cartografía basada en marcadores puede identificar regiones cromosómicas en donde se encuentran QTL, pero identificar genes cuantitativos individualmente requiere normalmente técnicas adicionales. Un planteamiento es desarrollar marcadores del DNA que estén fuertemente ligados a un gen de interés y luego usar la clonación posicional (véase el Capítulo 22) para identificar a dicho gen. Claramente, encontrar y caracterizar a todos los genes implicados en un carácter cuantitativo es una tarea larga y compleja. El *fw2.2* es de momento uno de los pocos genes cuantitativos que se ha aislado, clonado y estudiado en detalle. Sin embargo, cartografiar QTL y definir las funciones de los genes presentes en dichas regiones en plantas importantes agrícolamente incrementará los programas diseñados para mejorar la producción de las cosechas. Estos estudios también preparan el camino para investigaciones similares de genes en animales, incluida nuestra propia especie.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

La revolución verde revisitada

De los más de 6 mil millones de personas que pueblan la Tierra, unos 750 millones no tienen bastante para comer. A pesar de los esfuerzos para limitar el crecimiento poblacional, se espera que durante las siguientes décadas, un millón de personas se una cada año a pasar hambre.

¿Seremos capaces de resolver este problema? El pasado nos da algunas razones para ser optimistas. En las décadas de 1950 y 1960, ante la amenaza del incremento de la población, los científicos de plantas de todo el mundo acordaron aumentar la producción de las cosechas, de las tres gramíneas más importantes, trigo, arroz y maíz. Estos esfuerzos se conocieron como la Revolución Verde. El planteamiento fue triple: (1) aumentar la utilización de fertilizantes, insecticidas y agua para irrigación; (2) preparar más terrenos para cultivo y (3) desarrollar variedades mejoradas de plantas cultivadas mediante una intensiva mejora por cruzamientos. Aunque ha tenido mucho éxito en años recientes, la tasa de incremento en producción de grano se ha hecho más lenta. Si la producción de alimento tiene que mantener el ritmo con el incremento previsto de la población mundial, los mejoradores de plantas cultivadas tendrán que depender más y más de la mejora genética para conseguir mayores producciones. Pero, ¿es esto posible? ¿Nos estamos acercando a los límites teóricos de producción en plantas cultivadas importantes? Trabajos recientes con el arroz sugieren que la respuesta a esta cuestión es un sonoro no.

El arroz ocupa el tercer puesto en la producción mundial, justo detrás del trigo y del maíz. Cerca de 2 mil millones de personas, un tercio de la población mundial, dependen del arroz como su alimento básico. La mayoría de las cosechas de arroz en el mundo se cultivan y se consumen en Asia, pero también es una dieta de primera necesidad en África y Centroamérica. La Revolución Verde para el arroz comenzó en 1960, con el establecimiento del Instituto Internacional de Investigación del Arroz (IIIA) ubicado en Los Baños, Filipinas. El objetivo fue cultivar arroz con mejoras en resistencia a enfermedades y con mayor producción. Los mejoradores tuvieron incluso demasiado éxito: Las primeras variedades de alta producción eran tan pesadas en sus extremos por los granos que tendían a encamarse. Para reducir el encamado los mejoradores del IIIA cruzaron una línea de alta producción con una variedad nativa enana para dar lugar a líneas semi-enanas, que se introdujeron en los agricultores en 1966. Debido en gran parte a la adopción de las líneas semi-enanas, la producción mundial de arroz se dobló en los siguientes 25 años.

Sin embargo, los mejoradores de arroz no se pueden dormir en sus laureles, ya que la producción de las modernas variedades de arroz no se ha incrementado mucho en años recientes. Las predicciones sugieren que para mantener el paso con el crecimiento de la población durante los próximos 30 años, sería necesario incrementar en un 70 por ciento las cosechas de

arroz. Los mejoradores están ahora buscando variedades silvestres de arroz para mejorar más las cosechas. Liderando el camino se encuentran Susan McCouch, Steven Tanksley y sus colaboradores de la Cornell University. Para probar la hipótesis de que las especies silvestres de arroz llevan genes que mejorarán la producción de las variedades cultivadas, cruzaron el arroz cultivado *(Oryza sativa)* con una especie ancestral silvestre de baja producción *(Oryza rufipogon)* y luego retrocruzaron al híbrido interespecífico con el arroz cultivado durante tres generaciones. En teoría, esto daría lugar a líneas con genomas con el 95 por ciento de *O. sativa* y el 5 por ciento de *O. rufipogon*. Cuando se comprobaron estas líneas retrocruzadas en cuanto a la producción de grano, se encontró que varias de ellas producían más del 30 por ciento del arroz cultivado. Estos resultados demostraban claramente que incluso aunque los parientes silvestres del arroz tenían baja producción y parecían ser inferiores al arroz cultivado, todavía llevaban genes que incrementaban la producción en las variedades de arroz de elite. Será ahora cuando los mejoradores exploten los parientes silvestres del arroz.

Pero introducir genes favorables de un pariente silvestre en una variedad cultivada mediante la técnica convencional es un proceso largo y complicado, que requiere a menudo décadas o más de cruzamientos, selección, retrocruces y más selección. Las mejoras futuras en especies cultivadas debe de ser más rápida si queremos mantener el aumento de las cosechas con el crecimiento de la población. Afortunadamente, las técnicas modernas de cartografía genética han permitido la identificación de QTL que controlan caracteres complejos como producción y resistencia a enfermedades. Esto hace posible un planteamiento más directo para mejorar las cosechas, que se ha denominado el *método avanzado de retrocruces de QTL*.

Primero, una variedad cultivada se cruza con un pariente silvestre, como el cruce de *O. sativa* con *O. rufipogon*. Entonces el híbrido se retrocruza con la variedad cultivada para dar lugar a líneas que tengan una pequeña fracción del genoma «silvestre». Se seleccionan las líneas retrocruzadas con las mejores cualidades (p.e., mayor producción o mayor resistencia a enfermedades) y se identifican los «QTL silvestres» responsables del mejor rendimiento utilizando mapas de ligamiento molecular detallados. Una vez que se han descubierto por este método los QTL beneficiosos, pueden introducirse en otras variedades cultivadas. Con el fin de que esta estrategia tenga éxito, es esencial que los parientes silvestres se conserven como almacén de genes potencialmente útiles. En la década de 1970 comenzaron esfuerzos para proteger a los parientes de plantas cultivadas en su hábitat natural y conservarlos en bancos de germoplasma. Como ha demostrado el trabajo de McCouch y Tanksley y otros, no es posible predecir qué variedades silvestres pueden ser necesarias dentro de décadas o incluso centurias para contribuir con sus alelos beneficiosos a las variedades cultivadas. Para evitar la pérdida de genes superiores, se debe conservar el espectro más amplio posible de especies silvestres, incluso aquellas que no tienen características favorables obvias.

Hace casi 60 años, el gran genético ruso de vegetales N.I. Vavilov sugería que los parientes silvestres de las plantas cultivadas podían ser el origen de genes para mejorar la agricultura. En el siglo que comienza, la visión de Vavilov puede finalmente realizarse, cuando genes de parientes de plantas cultivadas largo tiempo despreciadas, se identifiquen por nuevos métodos moleculares e inicien una nueva revolución verde.

Referencias

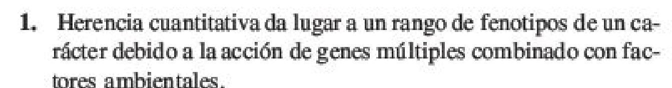
Mann, C. 1997. Reseeding the green revolution. *Science* 277:1038-43.

Ronald, P.C. 1997. Making rice disease-resistant. *Sci. Am.* (Nov.) 277:98-105.

Tanksley, S.D., and McCouch, S.R. 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063-66.

Xiao, J. *et al.* 1996. Genes from wild rice improve yield. *Nature* 384:223-24.

RESUMEN DEL CAPÍTULO



1. Herencia cuantitativa da lugar a un rango de fenotipos de un carácter debido a la acción de genes múltiples combinado con factores ambientales.
2. Muchos caracteres cuantitativos poligénicos muestran variación continua que no puede clasificarse en clases fenotípicas discretas. Algunos caracteres con umbral son también poligénicos, aunque tengan un menor número de clases fenotípicas distintas.
3. Para analizar los caracteres cuantitativos se utilizan métodos estadísticos, que incluyen la media, la varianza, la desviación típica, el error típico y la covarianza.
4. La heredabilidad estima la contribución relativa de los factores genéticos respecto de los ambientales en el rango de variación fenotípica observada en un carácter cuantitativo. Los estudios de gemelos se utilizan para estimar la heredabilidad en caracteres poligénicos humanos.
5. Los genes múltiples que contribuyen a un carácter cuantitativo se conocen como loci de caracteres cuantitativos o QTL. Para localizar y caracterizar los QTL se pueden usar técnicas de cartografía utilizando marcadores del DNA

IDEAS Y SOLUCIONES

1. En una planta, la altura varía de 6 a 36 cm. Cuando se cruzaron plantas de 6 y 36 cm, todos los descendientes tenían 21 cm. En F_2 se observó un rango continuo de alturas. Muchas se encontraban alrededor de 21 cm y 3 de 200 tenían 6 cm, como uno de los padres.

(a) ¿Cuál es el modo de herencia y cuántos pares de genes están implicados?

Solución: Se manifiesta herencia poligénica cuando está implicado un carácter continuo y en donde los alelos contribuyen aditivamente al fenotipo. La proporción 3/200 de plantas F_2 es la clave para determinar el número de genes. Esta se reduce a una proporción 1/66,7, muy próxima a 1/64. Utilizando la fórmula $1/4^n = 1/64$ (en donde 1/64 es igual a la proporción de fenotipos F_2 tan extremos como cualquiera de los padres P_1), $n = 3$. Por consiguiente hay implicados tres pares de genes.

(b) ¿En cuanto contribuye cada alelo aditivo a la altura?

Solución: La variación entre los dos fenotipos extremos es

$$36 - 6 = 30 \text{ cm.}$$

Ya que hay seis alelos potencialmente aditivos (*AABBCC*), cada uno contribuye con,

$$30/6 = 5 \text{ cm}$$

a la altura base de 6 cm, que se produce cuando no forman parte del genotipo alelos aditivos (*aabbcc*).

(c) Haga una lista de todos los genotipos que dan lugar a plantas con 31 cm.

Solución: Todos los genotipos que incluyen 5 alelos aditivos tendrán 31 cm (5 alelos (5 cm + 6 cm de altura base = 31 cm). Por consiguiente *AABBCc*, *AABbCC* y *AaBBCC* serán los genotipos que darán plantas con 31 cm.

(d) En un cruce distinto del mencionado anteriormente, se retrocruzó una planta de fenotipo y genotipo desconocidos, con los siguientes resultados

1/4 11 cm
2/4 16 cm
1/4 21 cm

Un avispado estudiante de genética se dio cuenta de que la planta desconocida podría tener un solo fenotipo, pero con cualquiera de tres genotipos posibles. ¿Cuáles son?

Solución: Cuando la planta desconocida se retrocruza (con *aabbcc*) puede contribuir a través de los gametos con uno, dos o tres alelos aditivos a fin de producir los tres fenotipos de los descendientes. Ya que no se observa ningún descendiente con 6 cm, la planta desconocida no puede contribuir con todos los alelos no aditivos (*abc*). Solo plantas que sean homozigotas para un locus y heterozigotas para los otros dos cumplirán estos criterios. Por consiguiente, el padre desconocido puede tener cualquiera de los tres genotipos, todos los cuales tienen un fenotipo de 26 cm:

AABbCc
AaBbCC
AaBBCc

Por ejemplo, en el primer genotipo (*AABbCc*),

$$AABbCc \times aabbcc$$

produce

1/4 *AaBbCc* 21 cm
1/4 *AaBbcc* 16 cm
1/4 *AabbCc* 16 cm
1/4 *Aabbcc* 11 cm

que es la proporción de fenotipos observada.

2. Los resultados que se muestran en la siguiente Tabla (en la parte superior de la página 613) se obtuvieron de la longitud de la mazorca del maíz:

Calcule los valores medios de la longitud de la mazorca para cada cepa paterna y la F_1.

Solución: Los valores medios se pueden calcular como sigue:

$$\overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} \quad P_A: \overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{378}{57} = 6{,}63$$

$$P_B: \overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{1{,}697}{101} = 16{,}80$$

$$F_1: \overline{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{836}{69} = 12{,}11.$$

3. Para la planta de maíz descrita en el Problema 2, compare la media de F_1 con la de cada cepa paterna. ¿Qué le indica acerca del tipo de actividad génica implicada?

Solución: La media de F1 (12,11) está casi a medio camino entre las medias paternas de 6,63 y 16,8. Esto indica que los genes en cuestión pueden tener un efecto aditivo.

4. A continuación se muestran la media y la varianza de la longitud de la corola de dos cepas muy consanguíneas de Nicotiana y de su descendencia:

Un padre (P_1) tiene corola corta y el otro padre (P_2) tiene corola larga. Calcule la heredabilidad en sentido amplio (H^2) de la longitud de la corola en esta planta.

Cepa	Media (mm)	Varianza (mm)
P_1 corto	40,47	3,12
P_2 largo	93,75	3,87
F_1 ($P_1 \times P_2$)	63,90	4,74
F_2 ($F_1 \times F_1$)	68,72	47,70

Solución: La fórmula para estimar la heredabilidad es $H^2 = V_G/V_P$, en donde V_G y V_P con los componentes de la varianza genética y fenotípica, respectivamente. El tema principal de este problema es obtener alguna estima de los dos componentes de la variación fenotípica: los factores genético y ambiental. La V_P es la combinación de las varianzas genética y ambiental. Ya que las dos cepas paternas son razas puras, se asume que son homozigotas, y las varianzas de 3,12 y 3,87 se consideran el resultado de la influencia ambiental. El promedio de estos dos valores es 3,5. La F_1 también es genéticamente homogénea y nos da una estimación

adicional del impacto de los factores ambientales. Promediando este valor con el de los padres,

$$\frac{4{,}74 + 3{,}50}{2} = 4{,}12$$

obtenemos una idea relativamente buena del impacto ambiental sobre el fenotipo. La varianza fenotípica en F_2 es la suma de los componentes genético (V_G) y ambiental (V_E). El componente ambiental lo hemos estimado en 4,12, por lo que 47,7 menos 4,12 nos da una estima de V_G, que es 43,58. Entonces, la heredabilidad es 43,58/47,7 ó 0,91. Este valor, cuando se presenta en forma de porcentaje, indica que alrededor del 91 por ciento de la variación en la longitud de la corola se debe a influencias genéticas.

	Longitud de la mazorca en cm																
	5	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**
Padre A	4	21	24	8													
Padre B									3	11	12	15	26	15	10	7	2
F_1					1	12	12	14	17	9	4						

Problemas y preguntas a discusión

1. ¿Cuál es la diferencia entre variación continua y discontinua? ¿Cuál de las dos es más probable que sea el resultado de herencia poligénica?
2. Defina los siguientes términos: (a) poligen, (b) alelos aditivos, (c) correlación, (d) gemelos monozigotos y dizigotos, (e) heredabilidad y (f) QTL.
3. Una planta homozigota con flores de 20 cm de diámetro se cruza con otra planta homozigota de la misma especie que tiene flores de 40 cm de diámetro. Todas las plantas F_1 tienen flores de 30 cm de diámetro. De 512 plantas F_2, 2 tenían flores de 20 cm de diámetro y 2 de 40 cm y las restante 510 plantas tenían flores con un tamaño entre ambos extremos.
   (a) Suponiendo que todos los alelos implicados actúan aditivamente, ¿cuántos genes controlan el tamaño de la flor en esta planta?
   (b) ¿Qué distribución de frecuencias del diámetro de la flor se esperaría en la descendencia de un cruce retrógrado entre una planta F_1 y el padre con flores más grandes?
   (c) Calcule la media, la varianza y la desviación típica del diámetro de la flor en la descendencia del cruce retrógrado de (b).
4. Una variedad de trigo de color rojo oscuro se cruza con una variedad de color blanco y se obtiene una F_1 de color intermedio. Cuando las plantas F_1 se cruzan y se obtiene una F_2 se produce una proporción de 1 rojo oscuro: 4 rojo:6 rosa:4 rosa claro: 1 blanco. Cruces posteriores revelaron que las plantas rojo oscuro y blancas eran cepas puras.
   (a) Basándose en la proporción de descendientes en F_2, ¿cuántos genes están implicados en la producción del color?
   (b) ¿Cuántos alelos aditivos son necesarios para producir cada fenotipo?
   (c) Asigne símbolos a estos alelos y haga una lista de los genotipos posibles que dan lugar a los fenotipos rojo y rosa claro
   (d) Prediga el resultado en F_1 y F_2 de un cruce entre cepas puras rosas y blancas.
5. La estatura en la especie humana depende de la acción de genes aditivos. Suponga que este carácter está controlado por cuatro loci, R, S, T y U y que los efectos ambientales son despreciables. En lugar de alelos aditivos frente a no aditivos, suponga que existen alelos aditivos y parcialmente aditivos. Los alelos aditivos contribuyen a la estatura con dos unidades y los parcialmente aditivos con una unidad.
   (a) ¿Pueden dos individuos de estatura intermedia tener descendientes mucho más altos o mucho más bajos que cualquiera de los padres? Y si es así, ¿cómo?
   (b) Si un individuo con la estatura mínima especificada por estos genes se casa con otro individuo de estatura intermedia, ¿alguno de los hijos será más alto que el padre alto? ¿Por qué si o por qué no?
6. Una variedad consanguínea de plantas tiene una altura media de 24 cm. Una segunda veriedad de la misma especie, pero de una región geográfica distinta, también tiene una altura de 24 cm. Cuando se cruzan plantas de las dos cepas, las plantas F_1 tienen la misma altura que los padres. Sin embargo, en F_2 se presenta un amplio rango de alturas; la mayoría son como las plantas P_1 y F_1 pero 4 de 1.000 tienen solo 12 cm y otras 4 de 1.000 tiene 36 cm de altura.
   (a) ¿Qué tipo de herencia se esta dando aquí?
   (b) ¿Cuántos pares de genes están implicados?
   (c) ¿Cuánto contribuye cada gen a la altura de la planta?
   (d) Indique un posible grupo de genotipos de las plantas P_1 y F_1 que pudieran explicar estos resultados.
   (e) Indique tres genotipos posibles que pudieran explicar las plantas F_2 que tienen 18 cm de altura; y de las que tienen 33 cm de altura.
7. Erma y Harvey eran una pareja de cerdos compatibles, pero con un aspecto curioso. La cola de Harvey tenía sólo 6 cm mientras que la de Erma tenía 30 cm. Todos los cochinillos de F_1 tenían 18 cm. Cuando se cruzaron entre si se obtuvo una numeroso F_2

(nietos de Erma y Harvey), con colas que iban de 6 a 30 cm, a intervalos de 4 (6, 10, 14, 18, 22, 26 y 30). Muchos tenían colas de 18 cm, mientras que 1/64 tenía colas de 6 cm y 1/64 de 30 cm.

(a) Explique cómo se hereda la longitud de la cola, describiendo el modo de herencia, indicando cuántos pares de genes están actuando y designando los genotipos de Erma y Harvey y de sus hijos de 18 cm.

(b) Si se cruza uno de los cerdos F_1 con 18 cm con otro de F_2 de 6 cm, y se obtuvieran muchos descendientes ¿qué proporción fenotípica se esperaría?

8. En la siguiente tabla se comparan las diferencias promedio de estatura, peso y número de crestas dactilares entre gemelos monozigotos (criados juntos y separados), gemelos dizigotos y hermanos no gemelos:

Carácter	MZ criados juntos	MZ criados separados	DZ criados juntos	Hermanos criados juntos
Estatura (cm)	1,7	1,8	4,4	4,5
Peso (kg)	1,9	4,5	4,5	4,7
Número de crestas	0,7	0,6	2,4	2,7

Basándose en estos datos, ¿cuál de estos caracteres cuantitativos tiene el mayor valor de heredabilidad?

9. ¿Qué tipo de estimas de la heredabilidad (en sentido amplio o en sentido estricto) se obtiene del estudio de gemelos en la especie humana?

10. Haga una lista de tantos caracteres de la especie humana como pueda que probablemente se encuentran bajo el control de un modo de herencia poligénico.

11. En un ensayo en una parcela se miden plantas de maíz con la distribución de alturas a intervalos de 10 cm, tal como se indica en la tabla:

Altura (cm)	Plantas (n.º)
100	20
110	60
120	90
130	130
140	180
150	120
160	70
170	50
180	40

Calcule (a) la altura media, (b) la varianza, (c) la desviación típica y (d) el error típico de la media. Dibuje un gráfico relacionando la altura de las plantas con su frecuencia. ¿Representan los valores una distribución normal? Basándose en sus cálculos, ¿cómo estimaría la variación en esta población?

12. Las siguientes varianzas se calcularon para dos caracteres en una piara de cerdos.

Carácter	V_P	V_G	V_A
Grasa del lomo	30,6	12,2	8,44
Longitud del cuerpo	52,4	26,4	11,7

(a) Calcule las heredabilidades en sentido amplio (H^2) y en sentido estricto (h^2) para cada carácter.

(b) ¿Cuál de los caracteres responderá mejor a la selección de un mejorador? ¿Por qué?

13. Se presentan la media y la varianza de la altura de la planta de dos variedades muy consanguíneas (P_1 y P_2) y de su descendencia (F_1 y F_2):

Variedad	Media (cm)	Varianza
P_1	34,2	4,2
P_2	55,3	3,8
F_1	44,2	5,6
F_2	46,3	10,3

Calcule la heredabilidad en sentido amplio (H^2) de la altura de la planta en esta especie.

14. En un estudio hipotético se investigó la cantidad de vitamina A y de colesterol en huevos de una población grande de gallinas. Se muestran las varianzas calculadas:

	Carácter	
Varianza	Vitamina A	Colesterol
V_P	123,5	862,0
V_E	96,2	484,6
V_A	12,0	192,1
V_D	15,3	185,3

(a) Calcule la heredabilidad en sentido estricto (h^2) para ambos caracteres.

(b) ¿Cuál de ellos responderá probablemente a la selección?

15. La siguiente tabla presenta las medidas de la longitud de las fibras y el peso de la lana en un pequeño rebaño de ocho ovejas.

	Longitud de la fibra (cm)	Peso de la lana (kg)
1	9,7	7,9
2	5,6	4,5
3	10,7	8,3
4	6,8	5,4
5	11,0	9,1
6	4,5	4,9
7	7,4	6,0
8	5,9	5,1

(a) ¿Cuál es la media, la varianza y la desviación típica para cada uno de estos caracteres?

(b) ¿Cuál es la covarianza de los dos caracteres?

(c) ¿Cuál es el coeficiente de correlación entre la longitud de la fibra y el peso de la lana?

(d) ¿Cree que el mayor peso de la lana esta ocasionada por un incremento de la longitud de las fibras? ¿Por qué si o por qué no?

16. En un rebaño de vacas lecheras la heredabilidad en sentido estricto para el contenido en proteína de la leche es 0,76 y para el contenido graso es 0,82. El coeficiente de correlación entre el contenido en proteína y el contenido graso es 0,91. Si el ganadero selecciona las vacas que producen más grasa en su leche, ¿cuál

será el efecto más probable en el contenido proteico de la leche en la generación siguiente?

17. En la evaluación del aprendizaje en *Drosophila*, se puede entrenar a las moscas a evitar ciertas señales olfativas. En una población se requirió una media de 8,5 pruebas. Se cruzaron entre si moscas de un subgrupo de esta población que aprendió más rápidamente (media = 6,0) y se examinó su descendencia. Estas moscas demostraron un valor medio de 7,5. Calcule la heredabilidad realizada del aprendizaje olfativo en *Drosophila*.

18. Suponga que desea obtener una población de *Drosophila* que aprenda rápidamente a evitar ciertas sustancias que las moscas pueden detectar por el olor. Basándose en la estima de la heredabilidad del Problema 17, ¿valdría la pena hacer selección artificial? ¿Por qué si o por qué no?

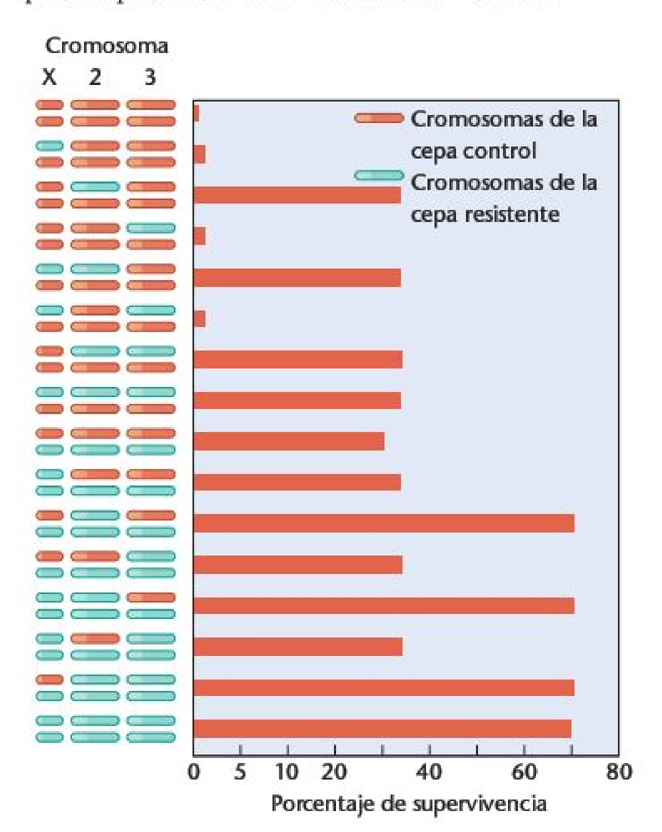
19. Se estudió una población de plantas de tomate cuyos frutos tenían un peso medio de 60 g, y una $h^2 = 0{,}3$. Prediga el peso medio de la descendencia si de la población inicial se seleccionan plantas de tomate cuyos frutos tienen un peso medio de 80 g y se cruzan entre si.

20. En una población de 100 plantas de arroz, consanguíneas y genotípicamente idénticas, la varianza para la producción de grano es 4,67. ¿Cuál es la heredabilidad para la producción? ¿Aconsejaría a un mejorador de arroz que mejorase la producción en esta cepa de plantas de arroz por selección?

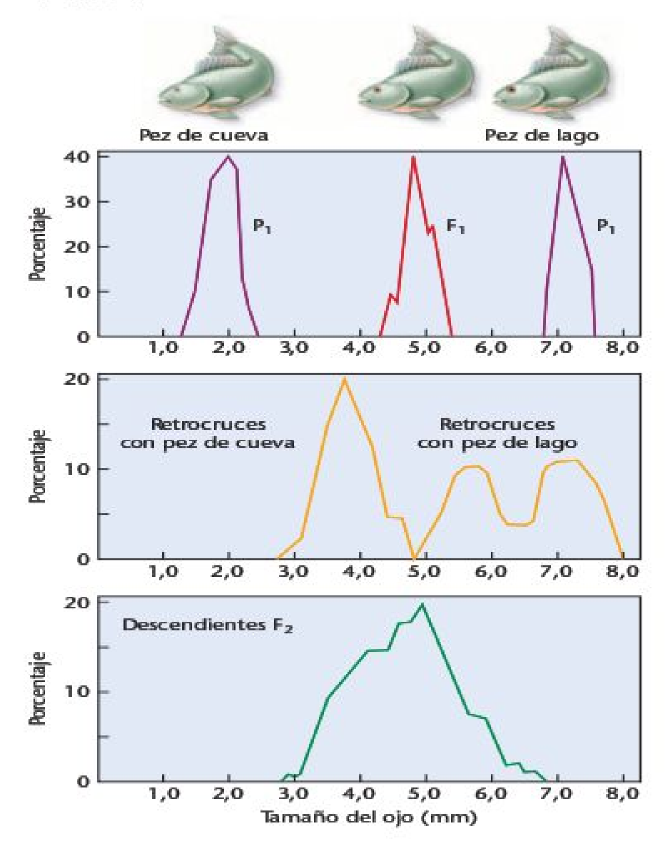


Problemas extra-picantes

21. Se aisló una cepa mutante de Drosophila que era resistente a un insecticida experimental, mientras que las moscas normales (silvestres) eran sensibles. Después del cruce entre moscas resistentes y moscas sensibles, se aislaron poblaciones que tenían varias combinaciones de cromosomas de las dos cepas. Cada una de ellas se comprobó en cuanto a su resistencia, como se muestra en la figura siguiente. Analice los datos y deduzca las conclusiones apropiadas acerca de qué cromosomas tienen un gen responsable para la herencia de la resistencia al insecticida.



22. En 1988, Horst Wilkens investigó un pez ciego de una cueva, comparándolo con miembros de una especie gemela con visión normal que se encontraba en un lago. (Los llamaremos pez de cueva y pez de lago.) Encontró que los ojos del pez de cueva eran unas siete veces menores que los ojos del pez de lago. Los híbridos F_1 tenían ojos de tamaño intermedio. Estos datos, así como los resultados de los cruces $F_1 \times F_1$ y los cruces retrógrados ($F_1 \times$ pez de cueva y $F_1 \times$ pez de lago), se presentan a continuación.



Examine los resultados de Wilkens y responda a las siguientes preguntas:

(a) Basándose estrictamente en los resultados iniciales de los cruces de Wilkens en F_1 y F_2, ¿cuál es la explicación más factible de la herencia del tamaño del ojo?

(b) Basándose en los resultados del cruce retrógrado entre el pez de cueva y la F_1, ¿apoyan su explicación? Explíquelo.

(c) Basándose en los resultados del cruce retrógrado entre el pez de lago y la F_1, ¿apoyan su explicación? Explíquelo.

(d) Wilkens examinó unos 1.000 descendientes F_2 y estimó que estaban implicados de 6 a 7 genes en la determinación del tamaño del ojo. ¿Es el tamaño de la muestra adecuado para justificar esta conclusión? Proponga un protocolo experimental para comprobar esta hipótesis.

(e) Al comparar el ojo en embriones del pez de cueva y del pez de lago se observó que en ambos alcanzaba, aproximadamente, un diámetro de 4 mm. Sin embargo, en el pez de lago continuaba el crecimiento, mientras que en el pez de cueva se reducía bastante. Especule sobre el papel de los genes implicados en este problema. [*Referencia:* Wilkens, H. (1988). *Ecol. Biol.* 23:271-367.]

23. Una planta de 3 pulgadas se cruzó con otra de 15 pulgadas y todas las plantas F_1 tenían 9 pulgadas. En F_2 las plantas presentaron una distribución normal, con alturas de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 pulgadas,

(a) ¿Que proporciones constituirán la «distribución normal» en F_2?

(b) ¿Qué resultado se obtendrá si las plantas F_1 se retrocruzan con plantas homozigotas para todos los alelos no aditivos?

24. La tabla que sigue da el porcentaje de parejas de gemelos estudiados en la que ambos expresaban el mismo fenotipo para un carácter (concordancia). Los porcentajes se refieren a distintos caracteres en gemelos monozigotos (MZ) y dizigotos (DZ). Suponiendo que los dos gemelos de una pareja se criaron juntos en el mismo ambiente, ¿qué se puede concluir acerca de la importancia relativa de los factores genéticos frente a los ambientales para cada carácter?

Carácter	% de MZ	% de DZ
Tipo sanguíneo	100	66
Color de los ojos	99	28
Retraso mental	97	37
Sarampión	95	87
Color del pelo	89	22
Diestro/zurdo	79	77
Epilepsia idiopática	72	15
Esquizofrenia	69	10
Diabetes	65	18
Alergia idéntica	59	5
Labio partido	42	5
Pies zambos	32	3
Cáncer mamario	6	3

25. En un cruce entre una cepa de cobayas grandes con una de cobayas pequeñas, la F_1 era fenotípicamente uniforme, con un tamaño intermedio entre las dos cepas paternas. De 1.014 individuos, 3 tenían aproximadamente el mismo tamaño que la cepa paterna pequeña y 5 aproximadamente del mismo tamaño que la cepa paterna grande. ¿Cuántos pares de genes están implicados en la herencia del tamaño en estas cepas de cobayas?

26. El tipo A1B de braquidactilia (falanges medias cortas) es un carácter determinado genéticamente, que se sitúa en el brazo corto del cromosoma 5 de la especie humana. Si se clasifican a los individuos como teniendo o no braquidactilia, el carácter parece que depende de un solo locus, con un patrón de herencia parcialmente dominante. Sin embargo, si se examinan los dedos de manos y pies de los individuos afectados, se aprecia un rango de expresión desde dedos muy cortos a dedos sólo ligeramente cortos. ¿Qué es lo que podría causar tal variación en la expresión de la braquidactilia?

27. En una serie de cruces entre dos cepas puras de melocotones, la F_1 fue uniforme, con melocotones de unos 30 g. El peso de los frutos de F_2 iba de 38 a 22 g, con intervalos de 2 g. (a) Utilizando estos datos determine el número de loci poligénicos implicados en la herencia del peso del melocotón. (b) Usando símbolos de su elección, dé los genotipos de los padres y de F_1.

28. Los estudiantes de un laboratorio de genética comienzan un experimento para intentar aumentar la tolerancia al calor en dos cepas de *Drosophila melanogaster*. Una cepa se había capturado en la naturaleza seis semanas antes de que el experimento comenzara; la otra se obtuvo de una colección de *Drosophila* del laboratorio de la Universidad. ¿En qué cepa se esperaría una respuesta más rápida y amplia a la selección por tolerancia al calor?

29. Considere una planta de cepa pura, *AABBCC*, que se cruza con otra también de cepa pura, *aabbcc*, cuyos descendientes son *AaBbCc*. Si se cruza la F_1, en donde es operativa la transmisión independiente, la fracción esperada de descendientes de cada clase fenotípica se obtiene por la expresión $N!/[M!(N - M!)]$, en donde N es el número total de alelos (seis en este caso) y M es el número de alelos mayúscula. En el cruce $AaBbC \times AaBbCc$, ¿qué proporción de descendientes se esperaría que tuvieran dos alelos mayúscula?

30. La displasia de cadera canina es un carácter cuantitativo que continúa afectando a muchas razas de perros, a pesar de los esfuerzos durante 40 años para reducir su impacto. Los criadores y veterinarios se basan en radiografías y en los registros genealógicos para incrementar el desarrollo de esquemas de cruces y reducir su incidencia. Datos recientes (Wood and Lakhani, 2003, *Vet Rec.* 152:69-72) indican que hay un efecto del «mes de nacimiento» sobre la displasia de cadera en los labradores perdigueros y en los setter Gordon, en donde la frecuencia y grado de expresión de este trastorno varía dependiendo del momento del año en que nacieron los perros. Especule sobre cómo los mejoradores intentarán eliminar por «selección» esta anomalía y qué indica el fenómeno de mes del nacimiento sobre la expresión del carácter poligénico.

Lecturas seleccionadas

Brink, R., ed. 1967. *Heritage from Mendel.* Madison: University of Wisconsin Press.

Browman, K.W. 2001. Review of statistical methods of QTL mapping in experimental crosses. *Lab Animal* 30:44-52.

Crow, J.F. 1993. Francis Galton: Count and measure, measure and count. *Genetics* 135:1.

Dudley, J.W. 1977. 76 generations of selection for oil and protein percentage in maize. In *Proc. Intern. Conf. on Quant. Genet.* E. Pollack, O. Kempthorne, and T. Bailey eds. pp. 459-73. Ames: Iowa State University Press.

Falconer, D.S., and Mackay, F.C. 1996. *Introduction to quantitative genetics,* 4th ed. Essex, England: Longman.

Farber, S. 1980. *Identical twins reared apart.* New York: Basic Books.

Feldman, M.W., and Lewontin, R.C. 1975. The heritability hangup. *Science* 190:1163-66.

Frary, A., et al. 2000. *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289:85-88.

Haley, C. 1991. Use of DNA fingerprints for the detection of major genes for quantitative traits in domestic species. *Anim. Genet.* 22:259-77.

______1996. Livestock QTLs: Bringing home the bacon. *Trends Genet.* 11:488-90.

Lander, E., and Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-99.

Lander, E., and Schork, N. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-48.

Lewontin, R.C. 1974. The analysis of variance and the analysis of causes. *Am. J. Hum. Genet.* 26:400-11.

Lynch, M., and Walsh, B. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits.* Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Macy, T.F.C. 2001. Quantitative trait loci in *Drosophila. Nature Reviews Genetics* 2:11-19.

Newman, H.H., Freeman, F.N., and Holzinger, K.T. 1937. *Twins: A study of heredity and environment.* Chicago: University of Chicago Press.

Paterson, A., Deverna, J., Lanini, B., and Tanksley, S. 1990. Fine mapping of quantitative traits loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecific cross of tomato. *Genetics* 124:735-42.

Plomin, R., McClearn, G., Gora-Maslak, G., and Neiderhiser, J. 1991. Use of recombinant inbred strains to detect quantitative trait loci associated with behavior. *Behav. Genet.* 21:99-116.

Stuber, C.W. 1996. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. *Trends Genet.* 11:477-87.

Tanksley, S.D. 2004. The genetic, developmental and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* 16:S181-S189.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Genética de poblaciones



Estas mariquitas, de las montañas Chiricahua de Arizona, muestran considerable variación fenotípica.

Conceptos del capítulo

- Las frecuencias alélicas en el conjunto de genes de una población pueden variar en el espacio y en el tiempo.
- La relación entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en una población ideal viene descrita por la ley de Hardy-Weinberg.
- La selección natural es la fuerza principal que impulsa el cambio de las frecuencias génicas y la evolución de las poblaciones.
- La migración y la deriva también pueden dar lugar a cambios en las frecuencias alélicas.
- El apareamiento no aleatorio cambia las frecuencias genotípicas de las poblaciones, pero no las frecuencias alélicas.
- La mutación da origen a nuevos alelos en el conjunto de genes de una población.

Hacia mediados del siglo XIX, cuando Alfred Russel Wallace y Charles Darwin identificaron la selección natural como el mecanismo de la evolución adaptativa, no había un modelo preciso de los mecanismos responsables de la variación y de la herencia. Gregor Mendel publicó su trabajo sobre la herencia de caracteres en 1866, pero tuvo poco impacto en su tiempo. El redescubrimiento del trabajo de Mendel en 1900 inició un esfuerzo de 30 años para reconciliar el concepto de genes y alelos de Mendel con la teoría de la evolución. Una idea clave fue que los genéticos se dieron cuenta de que la frecuencia a la que se encuentran los caracteres fenotípicos en una población está relacionada con la abundancia relativa de los alelos que influyen en los mismos. Esto puso los fundamentos para la aparición de la **genética de poblaciones**, el estudio de la variación genética en las poblaciones y como cambia con el tiempo. Los genéticos de poblaciones investigan patrones de variación genética o **estructura genética** dentro y entre grupos de individuos que se cruzan entre si. Como los cambios en la estructura genética es la base de la evolución de una población, la genética de poblaciones se ha convertido en una subdisciplina importante de la biología evolutiva.

A principios del siglo XX una serie de investigadores, como G. Udny Yule, William Castle, Godfrey Hardy y Wilhelm Weinberg, formularon los principios básicos de la genética de poblaciones. Los genéticos teóricos Sewall Wright, Ronald Fisher y J.B.S. Haldane desarrollaron modelos matemáticos para describir la estructura genética de las poblaciones. Más recientemente, investigadores de campo han podido comprobar estos modelos utilizando técnicas bioquímicas y moleculares para medir directamente la variación a los niveles proteico y de DNA. Estos experimentos examinan las frecuencias alélicas y las fuerzas que actúan sobre ellas, como la selección, mutación, migración y deriva genética. En este capítulo consideraremos aspectos generales de la genética de poblaciones y discutiremos otras áreas de la genética relacionadas con la evolución.

¿CÓMO LO SABEMOS?

Los genéticos de poblaciones estudian cambios de las frecuencias alélicas en el conjunto de genes de la población en el tiempo, la naturaleza y la diversidad genética de las poblaciones y los patrones de distribución de los diferentes genotipos. Cuando lea este capítulo piense en estas cuestiones: ¿Cómo detectan los genéticos la presencia de diferentes alelos en una población? ¿Cómo se identifican los diferentes genotipos? ¿Son las diferencias en los fenotipos morfológicos (la apariencia física de un individuo) el único modo de identificar individuos genéticamente distintos en una población?

25.1 Las frecuencias alélicas en el conjunto de genes de una población varían en el espacio y en el tiempo

Una **población** es un grupo de individuos que comparten un conjunto de genes, que viven en la misma área geográfica y que real o potencialmente se cruzan entre si. Todos los alelos compartidos por estos individuos constituyen el **acervo genético** (conjunto de genes) de la población. A menudo, cuando examinamos un locus dado en esta población, encontramos que la distribución de los alelos de dicho locus da lugar a individuos con genotipos distintos. Un elemento clave de la genética de poblaciones es el cálculo de las frecuencias de los distintos alelos en el conjunto de genes, las frecuencias de los distintos genotipos de la población y cómo cambian estas frecuencias de una generación a la siguiente. Los genéticos de poblaciones utilizan estos cálculos para plantearse cuestiones como: ¿cuánta variación genética hay en una población? Los genotipos, ¿se distribuyen aleatoriamente en el tiempo y en el espacio o hay patrones perceptibles? ¿Qué procesos afectan a la composición del conjunto de genes de una población? ¿Producen estos procesos divergencia genética entre poblaciones?

Las poblaciones son dinámicas; pueden expansionarse y contraerse mediante cambios en las tasas de nacimientos o fallecimientos, por migración o por contactos con otras poblaciones. A menudo algunos individuos de una población tienen más descendientes que otros, contribuyendo con una cantidad desproporcionada de sus alelos a la generación siguientes. Así, la naturaleza dinámica de una población puede, con el tiempo, dar lugar a cambios en la estructura genética de la población.

25.2 La ley de Hardy-Weinberg describe las relaciones entre las frecuencias alélicas y las genotípicas en una población ideal

La relación teórica entre las proporciones relativas de los alelos del conjunto de genes y las frecuencias de los diferentes genotipos en la población, fue elegantemente descrito a principios del siglo XX en un modelo matemático desarrollado independientemente por el matemático británico Godfrey H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg. Este modelo, llamado la **ley de Hardy-Weinberg**, describe lo que les sucede a los alelos y a los genotipos en una población «ideal» que es infinitamente grande, con apareamiento al azar, y que no está sujeta a ninguna fuerza evolutiva, como la mutación, la migración o la selección. En estas condiciones, el modelo de Hardy-Weinberg hace dos predicciones:

1. Las frecuencias de los alelos en el conjunto de genes no cambia con el tiempo.
2. Si se consideran dos alelos de un locus, *A* y *a*, entonces, después de una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos *AA*:*Aa*:*aa* en la población se pueden calcular así

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

en donde p = frecuencia del alelo *A* y q = frecuencia del alelo *a*.

Una población que cumple estos criterios, y en la que las frecuencias *p* y *q* de los dos alelos de un locus dan lugar a las frecuencias genotípicas predichas, se dice que está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Como veremos más tarde en este capítulo, es raro que una población esté totalmente de acuerdo con el modelo de Hardy-Weinberg y que todas las frecuencias alélicas y genotípicas permanezcan sin cambio generación tras generación.

El modelo de Hardy-Weinberg utiliza los principios mendelianos de la segregación y de la probabilidad simple para explicar las relaciones entre las frecuencias alélicas y genotípicas en una población. Podemos demostrar como funciona esto considerando el ejemplo de un locus con dos alelos, *A* y *a*, en una población en donde la frecuencia de *A* es 0,7 y la frecuencia de *a* 0,3. Advierta que $0{,}7 + 0{,}3 = 1$, indicando que todos los alelos del gen *A* presentes en el conjunto de genes se tienen en cuenta. Supongamos que los individuos se aparean al azar, siguiendo los requerimientos de Hardy-Weinberg, de tal manera que para cualquier zigoto, la probabilidad de que el gameto femenino lleve *A* es 0,7 y la probabilidad de que el gameto masculino lleve *A* también es 0,7. La probabilidad de que *ambos* gametos lleven *A* es $0{,}7 \times 0{,}7 = 0{,}49$. Así, predecimos que el genotipo *AA* se producirá en el 49 por ciento de las veces. La probabilidad de que un zigoto se forme por la unión de un gameto femenino que lleve *A* y uno masculino que lleve *a* es $0{,}7 \times 0{,}3 = 0{,}21$ y la probabilidad de que un zigoto se forme por la unión de un gameto femenino que lleve *a* y uno masculino que lleve *A* es $0{,}3 \times 0{,}7 = 0{,}21$, por lo que la frecuencia del genotipo *Aa* será $0{,}21 + 0{,}21 = 0{,}42 = 42$ por ciento. Finalmente, la probabilidad de que un zigoto se forme por dos gametos que lleven *a* es $0{,}3 \times 0{,}3 = 0{,}09$, por lo que la frecuencia del genotipo *aa* será el 9 por ciento. Como comprobación de nuestro cálculo, advierta que $0{,}49 + 0{,}42 + 0{,}09 = 1$, confirmando que hemos tenido en cuenta a todos los zigotos. Estos cálculos se resumen en la Figura 25.1

Comenzábamos con la frecuencia de un alelo dado en un conjunto de genes específico y calculábamos la probabilidad de que se produjeran ciertos genotipos en dicho conjunto de genes. Cuando los zigotos se desarrollan hasta adulto y se reproducen, ¿cuál será la distribución de las frecuencias de los alelos en el nuevo conjunto de genes? Con la ley de Hardy-Weinberg asumimos que todos los genotipos tienen tasas iguales de supervivencia y reproducción. Esto quiere decir que en la siguiente generación todos los genotipos contribuirán de igual manera al nuevo conjunto de genes. Los individuos *AA* constituyen el 49 por ciento de la población y se puede predecir que los gametos que produzcan constituirán el 49 por ciento del nuevo conjunto de genes. Todos estos gametos llevan el alelo *A*. De igual manera, los individuos *Aa* constituyen el 42 por ciento de la población, por lo que predecimos que sus gametos constituirán el 42 por ciento del nuevo conjunto de genes. La mitad de esos gametos (0,5) llevarán el alelo *A*. Así, la frecuencia del alelo *A* en el conjunto de genes será $0{,}49 + (0{,}5)0{,}42 = 0{,}7$. La otra mitad de los gametos que producen los individuos Aa llevarán el alelo *a*. Los individuos *aa* constituyen el 9 por ciento de la población, por lo que sus gametos constituirán el 9 por ciento del nuevo conjunto de genes. Todos estos gametos llevan el alelo *a*. Así, podemos predecir que el alelo *a* en el nuevo conjunto de genes será $(0{,}5)0{,}42 + 0{,}09 = 0{,}3$. Como comprobación de nuestro cálculo, advierta que $0{,}7 + 0{,}3 = 1$, que abarca a todos los gametos del conjunto de genes de la generación nueva.

Hemos vuelto a donde comenzamos, con un conjunto de genes en el que la frecuencia del alelo *A* es 0,7 y la frecuencia del alelo *a* es 0,3. Para el caso general de la ley de Hardy-Weinberg, para las frecuencias alélicas utilizamos variables en lugar de valores numéricos. Imagine un conjunto de genes en el que la frecuencia del alelo *A* es *p* y la frecuencias del alelo *a* es *q*, de tal manera que $p + q = 1$. Si extraemos al azar gametos masculinos y femeninos del conjunto de genes y los unimos para formar un zigoto, la probabilidad de que ambos lleven el alelo *A* es $p \times p$. Así, la frecuencia del genotipo *AA* entre los zigotos será p^2. La probabilidad de que el gameto femenino lleve *A* y el masculino a es $p \times q$, y de que el gameto femenino lleve *a* y el masculino *A* es $q \times p$. Así, la frecuencia del genotipo *Aa* entre los zigotos es $2pq$. Finalmente, la probabilidad de que ambos gametos lleven *a* es $q \times q$, por lo que la frecuencia de

		Esperma	
		fr(*A*) = 0.7	fr(*a*) = 0.3
Óvulos	fr(*A*) = 0.7	fr(*AA*) = 0.7 × 0.7 = 0.49	fr(*Aa*) = 0.7 × 0.3 = 0.21
	fr(*a*) = 0.3	fr(*aA*) = 0.3 × 0.7 = 0.21	fr(*aa*) = 0.3 × 0.3 = 0.09

FIGURA 25.1 Cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. Los gametos representan muestras del conjunto de genes para formar los genotipos de la generación siguiente. En esta población, la frecuencia del alelo *A* es 0,7 y la del alelo *a* es 0,3. Las frecuencias de los genotipos de la generación siguiente son 0,49 para *AA*, 0,42 para *Aa* y 0,09 para *aa*. De acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, las frecuencias de *A* y *a* permanecen constantes de generación en generación.

Seminario Web 25.1
Genética de poblaciones

los genotipo *aa* entre los zigotos es q^2. Por consiguiente, la distribución de genotipos entre los zigotos es

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Esto se resume en la Figura 25.2.

Estos cálculos demuestran las dos principales predicciones de la ley de Hardy-Weinberg: Las frecuencias génicas de nuestra población no cambian de una generación a la siguiente y las frecuencias genotípicas después de una generación de cruzamientos al azar se pueden predecir a partir de las frecuencias alélicas. En otras palabras, esta población no cambia, o evoluciona, con respecto al locus que hemos examinado. Sin embargo, recuerde las suposiciones acerca de la población teórica descritas por el modelo de Hardy-Weinberg:

1. Los individuos de cualquier genotipo tienen iguales tasas de supervivencia e igual éxito reproductivo —es decir, no hay selección.
2. No aparecen nuevos alelos, o se convierte un alelo en otro, por mutación.
3. Los individuos no migran hacia o desde la población.
4. La población es infinitamente grande, que en términos prácticos significa que la población es lo suficientemente grande como para que los errores de muestreo y efectos aleatorios sean despreciables.
5. Los individuos de la población se aparean al azar.

Estas condiciones hacen que la ley de Hardy-Weinberg sea tan útil en la investigación de genética de poblaciones. Especificando las condiciones bajo las cuales la población no puede evolucionar, el modelo de Hardy-Weinberg identifica las fuerzas del mundo real que dan lugar a que las frecuencias alélicas cambien. En otras palabras, manteniendo ciertas condiciones constantes, Hardy-Weinberg aísla las fuerzas de la evolución y permite que sean cuantificadas. La aplicación del modelo de Hardy-Weinberg también puede revelar «genes neutros» en el conjunto de genes de una población —aquellos sobre los que no actúan las fuerzas de la evolución.

Óvulos \ Esperma	fr(*A*) = *p*	fr(*a*) = *q*
fr(*A*) = *p*	fr(*AA*) = p^2	fr(*Aa*) = *pq*
fr(*a*) = *q*	fr(*aA*) = *qp*	fr(*aa*) = q^2

FIGURA 25.2 Caso general de las frecuencias alélicas y genotípicas de acuerdo con Hardy-Weinberg. La frecuencia del alelo *A* es *p* y la del alelo *a* es *q*. Después del apareamiento, los tres genotipos *AA*, *Aa* y *aa* tienen las frecuencias p^2, $2pq$ y q^2, respectivamente.

Hay tres consecuencias adicionales importantes de la ley de Hardy-Weinberg. Primero, muestra que los caracteres dominantes no aumentan necesariamente de una generación a la siguiente. Segundo, demuestra que la **variabilidad genética** se puede mantener en una población ya que, una vez establecida en una población ideal, las frecuencias alélicas no varían. Tercero, si invocamos las condiciones de Hardy-Weinberg, entonces, conociendo la frecuencia de sólo un genotipo, podremos calcular las frecuencias de todos los otros genotipos de dicho locus. Esto es muy útil en genética humana porque podemos calcular la frecuencia de los portadores heterozigotos para un trastorno genético recesivo, incluso cuando todo lo que sabemos es la frecuencia de los individuos afectados (véase la Sección 25.4).

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.1 de la página 748 se le pide que calcule las frecuencias de un alelo dominante y uno recesivo de una población en donde se conocen las frecuencias de los fenotipos.

Sugerencia: Determine qué frecuencia alélica (*p* o *q*) tiene que estimar primero cuando los genotipos homozigotos dominantes y heterozigotos tienen el mismo fenotipo.

25.3 La ley de Hardy-Weinberg se puede aplicar a las poblaciones humanas

Para mostrar cómo se miden las frecuencias alélicas en poblaciones reales y para demostrar el tipo de preguntas contestadas por lo investigadores en genética de poblaciones, consideraremos el ejemplo de una población humana sacada de la investigación de factores genéticos que influyen en la susceptibilidad individual a la infección por el VIH-1, virus responsable del grueso de los casos de SIDA en el mundo. Es muy interesante para los investigadores del SIDA un pequeño número de individuos que, estando en alto riesgo (cómo tener relaciones sexuales sin protección con individuos VIH positivos), no se infectan. En 1996, Rong Liu y sus colegas descubrieron que dos individuos expuestos, pero no infectados, eran homozigotos para un alelo mutante del gen *CC-CKR5*.

El gen *CC-CKR5*, localizado en el cromosoma 3, codifica a la proteína C-C quemoquina receptor-5, o CCR5. Las quemoquinas son moléculas receptoras de señales asociadas con el sistema inmune. Cuando las glóbulos blancos con las proteínas receptoras CCR se unen a las quemoquinas, las células responden desplazándose hacia los tejidos inflamados para combatir la infección.

La proteína CCR5 es también un receptor para las cepas del VIH-1. Para penetrar en la célula, la proteína Env (abreviatura

de proteína «envelope» —de cubierta—) de la superficie del VIH-1 se une a la proteína CD4 en la superficie de la célula huésped. La unión a CD4 da lugar a que Env cambie de forma y establezca un segundo punto de contacto. Este segundo punto se une a CCR5 que, a su vez, inicia la fusión de la proteína de cubierta viral con la membrana de la célula huésped. La fusión de la envoltura vírica y la membrana celular introduce el corazón del virus VIH en el citoplasma de la célula huésped.

El alelo mutante del gen *CCR5* tiene una deleción de 32 pb en una de sus regiones codificadoras. En consecuencia, la proteína codificada por el alelo mutante es más corta y no funcional. La proteína nunca forma parte de la membrana celular, por lo que el VIH-1 no puede entrar en la célula. El alelo normal del gen se llama *CCR51* (al que llamaremos *1*) y su alelo con una deleción de 32 pb se llama *CCR5-Δ32* (al que llamaremos *Δ32*). Los dos individuos no infectados descritos por Liu tenían el genotipo *Δ32/Δ32*. Por ello, no tenían receptores CCR5 en la superficie de sus células y eran resistentes a la infección por el VIH-1 que necesita a CCR5 como correceptor.

Se han encontrado al menos tres individuos *Δ32/Δ32* infectados con el VIH.1. Curiosamente, los investigadores no han descubierto ningún efecto adverso asociado con este genotipo. Los heterozigotos con el genotipo *1/Δ32* son susceptibles a la infección por el VIH-1, pero las evidencias sugieren que el SIDA progresa más lentamente. La Tabla 25.1 resume los posibles genotipos del locus *CCR5* y los fenotipos asociados.

El descubrimiento del alelo *CCR5-Δ32*, y el hecho de que proporciona protección contra el SIDA, plantea dos cuestiones importantes: ¿Qué poblaciones humanas albergan al alelo *Δ32*, y cuál es su frecuencia? Para responder a estas cuestiones, varios grupos de investigación han analizado un gran número de personas de distintas poblaciones. Los genotipos se determinaron por análisis directo del DNA (Figura 25.3). Mi-

TABLA 25.1 **GENOTIPOS Y FENOTIPOS *CCR5***

Genotipo	Fenotipo
1/1	Susceptibilidad a cepas de VIH-1 trasmitidas sexualmente
1/Δ32	Susceptibilidad, pero con progresión lenta hacia el SIDA
Δ32/Δ32	Resistente a la mayoría de las cepas VIH-1 trasmitidas sexualmente

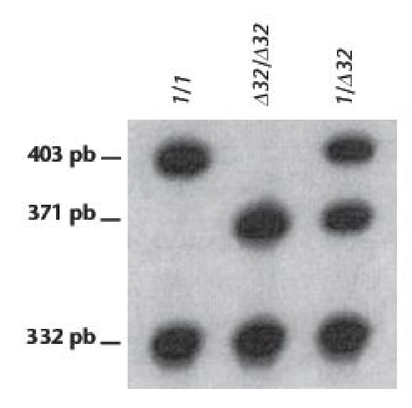


FIGURA 25.3 Variación alélica del gen *CCR5*. Michel Samson y sus colegas utilizaron la PCR para amplificar una parte del gen *CCR5* que tiene la deleción de 32 pb, cortaron los fragmentos de DNA resultantes con una enzima de restricción y corrieron los fragmentos en un gel de electroforesis. Cada carrera revela el genotipo de un solo individuo. El alelo 1 produce dos fragmentos de 332 pb y 403 pb; el alelo Δ32 produce dos fragmentos de 332 pb y 371 pb. El heterozigoto presenta tres bandas.

TABLA 25.2 **MÉTODOS PARA DETERMINAR LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS A PARTIR DE DATOS GENOTÍPICOS**

A. Contando los alelos

Genotipo	*1/1*	*1/Δ32*	*Δ32/32*	Total
Número de individuos	79	20	1	100
Número del alelo 1	158	20	0	178
Número del alelo *Δ32*	0	20	2	22
Número total de alelos	158	40	2	200

Frecuencia de *CCR5l* en la muestra: 178/200 = 0,89 = 89%
Frecuencia de *CCR5-Δ32* en la muestra: 22/200 = 0,11 = 11%

B. A partir de las frecuencias genotípicas

Genotipo	*1/1*	*1/Δ32*	*Δ32/Δ32*	Total
Número de individuos	79	20	1	100
Frecuencias genotípicas	79/100 = 0,79	20/100 = 0,20	1/100 = 0,01	1,00

Frecuencia de *CCR51* en la muestra: 0,79 + (0,5)0,20 = 0,89
Frecuencia de *CCR5-Δ32* en la muestra: (0,5)0,20 + 0,01 = 0,11

remos una muestra de una población de 100 franceses de Bretaña en la que 79 individuos tenían el genotipo *1/1*, 20 el genotipo *1/Δ32* y 1 el genotipo *Δ32/Δ32*. Esta muestra tiene 158 alelos *1* (que se encuentran en los individuos *1/1*) más 20 alelos *1* que llevan los individuos 1/Δ*32*, lo que hace un total de 178. La frecuencia del alelos *CCR51* en la muestra de la población es 178/200 = 0,89 = 89 por ciento. Hay 20 alelos *CCR5-Δ32* en los individuos 1/Δ*32* más 2 en el individuos *Δ32/Δ32*, lo que totaliza 22 alelos. La frecuencia del alelo *CCR5-Δ32* es así 22/200 = 0,11 = 11 por ciento. Advierta que $p + q = 1$, lo que confirma que hemos tenido en cuenta a todo el conjunto de genes. En la Tabla 25.2 se muestran los dos métodos para contabilizar las frecuencias de los alelos *1* y *Δ32* en la muestra de Bretaña.

En la Figura 25.4 se presentan las frecuencias del alelo *CCR5-Δ32* en las 18 poblaciones europeas analizadas. Los estudios muestran que las poblaciones del norte de Europa, alrededor del Mar Báltico, tienen las mayores frecuencias del alelo *Δ32*. Hay un gradiente sostenido de la frecuencia alélica de norte a sur, siendo las poblaciones de Cerdeña y de Grecia las de menor frecuencia. En poblaciones sin ascendencia europea, el alelo Δ32 prácticamente no se encuentra. La distribución global del alelo *Δ32,* muy dispersa, presenta un rompecabezas evolutivo al que volveremos más tarde en este capítulo.

¿Podemos esperar que el alelo *CCR5-Δ32* aumente en las poblaciones humanas en las que es raro? De lo que sabemos ahora sobre la ley de Hardy-Weinberg, podemos decir que (1) si los individuos de los tres genotipos tienen iguales tasas de supervivencia y reproducción, (2) si no hay mutación, (3) no hay migración diferencial desde o hacia la población, (4) la población es muy grande y (5) los individuos de la población eligen su pareja al azar con respecto al locus de interés, entonces la frecuencia del alelos *Δ32* en la poblaciones humanas no cambiará. Sin embargo, como veremos en la segunda mitad de este capítulo, cuando no se cumplen las condiciones de Hardy-Weinberg —debido a la selección natural, la mutación, la migración o la deriva genética— las frecuencias alélicas de la población pueden cambiar de una generación a la siguiente. Los cruces no aleatorios no alteran, por sí mismos, las frecuencias *alélicas*, pero alterando las frecuencias *genotípicas*, afectan directamente el curso de la evolución. La ley de Hardy-Weinberg les dice a los genéticos en donde buscar en la población para encontrar las causas de la evolución. Volveremos más tarde al alelo *CCR5-Δ32* en el capítulo para ver cómo una perspectiva en genética de poblaciones ha generado hipótesis fructíferas para nuevas investigaciones.

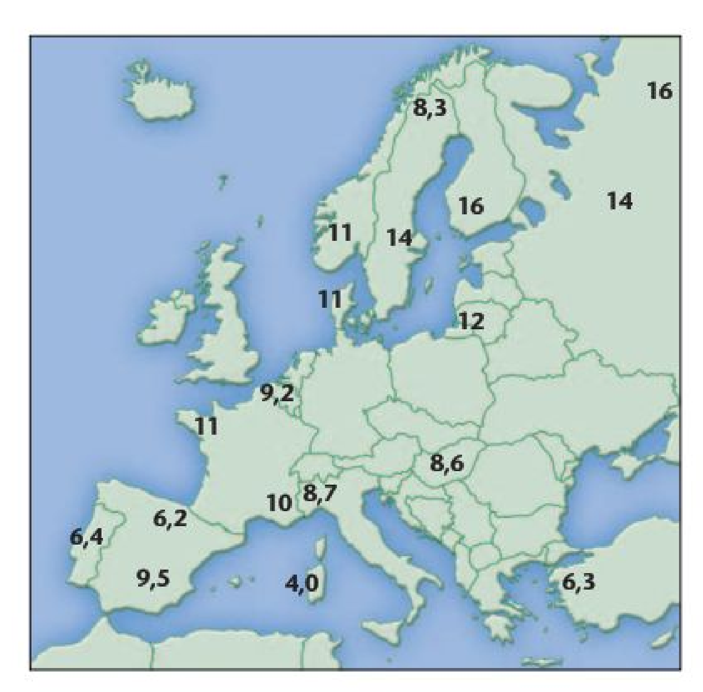


FIGURA 25.4 La frecuencia (en porcentajes) del alelo *CCR5-Δ32* en 18 poblaciones europeas.

Comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg

Una manera de confirmar si una o más de las condiciones de Hardy-Weinberg no se cumplen en una población dada es determinar si los genotipos de la población se encuentran en equilibrio. Para comprobarlo, tenemos que determinar primero las frecuencias genotípicas, bien directamente a partir de los fenotipos (si se pueden reconocer a los heterozigotos) o analizando las proteínas o las secuencias de DNA. Luego se pueden calcular las frecuencias alélicas a partir de las frecuencias genotípicas, como se demostró más arriba. Finalmente utilizamos las frecuencias alélicas de la generación paterna para predecir las frecuencias genotípicas de los descendientes. De acuerdo con la Ley de Hardy-Weinberg, se predice que las frecuencias genotípicas están de acuerdo con la relación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Si no lo están, entonces una o más de las condiciones no son válidas para la población en cuestión.

Utilizaremos los genotipos *CCR5* de una población de Bretaña para demostrar la ley de Hardy-Weinberg. La población tiene 283 individuos, de los que 223 tienen el genotipo *1/1*; 57 el genotipo *1/Δ32* y 3 el genotipo *Δ32/Δ32*. Estos números representan las frecuencias genotípicas de 223/283 = 0,788, 57/283 = 0,201 y 3/283 = 0,011, respectivamente. De las frecuencias genotípicas calculamos la frecuencia del alelo *CCR51* como 0,89 y del *CCR5Δ32* como 0,11. A partir de estas frecuencias alélicas, podemos utilizar la ley de Hardy-Weinberg para determinar si esta población está en equilibrio. Las frecuencias alélicas predicen las frecuencias genotípicas como sigue:

Frecuencia esperada del genotipo

$$1/1 = p^2 = (0{,}89)^2 = 0{,}792$$

Frecuencia esperada del genotipo

$$1/\Delta 32 = 2pq = 2(0{,}89)(0{,}11) = 0{,}196$$

Frecuencia esperada del genotipo

$$\Delta 32/\Delta 32 = q^2 = (0{,}11)^2 = 0{,}012$$

Estas frecuencias esperadas son casi idénticas a las frecuencias observadas. La comprobación de esta población no ha aportado evidencias de que las condiciones de Hardy-Weinberg estén siendo violadas. La conclusión se confirma mediante un análisis de χ^2. (Véase el Capítulo 3.) El valor de χ^2 en este caso es diminuto: 0,00023. Para ser significativo estadísticamente al nivel aceptado más generoso de $p = 0{,}05$, el valor de χ^2 tendría que ser 3,84. (En una prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg los grados de libertad son $k - 1 - m$, en donde k es el número de genotipos y m el número de frecuencias alélicas independientes estimadas de los datos.) Aquí $k = 3$ y $m = 1$, ya que calculando solo la frecuencia de un alelo podemos determinar la del otro alelo por sustracción. Así, tendremos $3 - 1 - 1 = 1$ (grados de libertad).

Por otro lado, si la comprobación de Hardy-Weinberg hubiera demostrado que la población no estaba en equilibrio, indicaría que una o más de las condiciones no se están cumpliendo. Therese Markow y colegas aportaron datos de una población humana que no estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Estudiaron 122 Havasupai, una población de nativos americanos de Arizona. Determinaron el genotipo de cada individuo de dos loci del complejo mayor de histoincompatibilidad (MHC). Estos genes, el *HLA-A* y el *HLA-B*, codifican proteínas implicadas en el sistema inmunológico de discriminación de lo propio respecto de lo extraño. El sistema inmunitario de los individuos heterozigotos en los loci MHC parece reconocer una gran diversidad de invasores foráneos y así se puede luchar mejor contra las enfermedades. Markow y colegas observaron significativamente más individuos que eran heterozigotos para ambos loci y menos homozigotos que lo que cabría esperar de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg. La violación de una de las dos, o las dos, condiciones de Hardy-Weinberg podría explicar el exceso de heterozigotos entre los Havasupai. Primero, los fetos, niños y adultos Havasupai que eran heterozigotos para los dos loci podían tener mayores tasa de supervivencia que los homozigotos (es decir, está actuando la selección). Segundo, en lugar de escoger la pareja al azar, el pueblo Havasupai puede, de alguna manera, preferir parejas cuyos genotipos MHC sean diferentes de los suyos.

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.6 de la página 748 se le pide que determine si dos poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, basándose en sus frecuencias genotípicas.

Sugerencia: Comience determinando las frecuencias alélicas a partir de estos datos.

25.4 La ley de Hardy-Weinberg se puede utilizar para alelos múltiples, caracteres ligados al X y para estimar la frecuencia de los heterozigotos

Habiendo establecido los fundamentos de la ley de Hardy-Weinberg, podemos ahora considerar cómo se puede utilizar para estimar frecuencias alélicas en poblaciones. Examinaremos los cálculos aplicados a alelos múltiples, caracteres ligados al X y a la frecuencia de heterozigotos.

Cálculo de las frecuencias de alelos múltiples

En las poblaciones es frecuente encontrar varios alelos de un locus. El grupo sanguíneo ABO en la especie humana (discutido en el Capítulo 4) es un ejemplo. El locus I (isoaglutinina) tiene tres alelos (I^A, I^B e I^0), que dan lugar a seis combinaciones genotípicas posibles ($I^AI^A, I^BI^B, I^0I^0, I^AI^B, I^AI^0, I^BI^0$). Recuerde que en este caso I^A e I^B son alelos codominantes y dominantes sobre I^0. La consecuencia es que los individuos homozigotos I^AI^A y los heterozigotos I^AI^0 son idénticos fenotípicamente, como lo son los individuos I^BI^B e I^BI^0, por lo que únicamente podremos distinguir cuatro combinaciones fenotípicas.

Añadiendo otra variable a la ecuación de Hardy-Weinberg, podemos calcular las frecuencias genotípicas y alélicas para la situación con tres alelos. Sean p, q y r la representación de las frecuencias de los alelos A, B y 0, respectivamente. Advierta que, debido a que son tres alelos

$$p + q + r = 1$$

De acuerdo con las condiciones de Hardy-Weinberg, la frecuencia de los genotipos vendrá dada por

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$$

Si conocemos las frecuencias de los tipos sanguíneos en una población, podremos estimar las frecuencias para los tres alelos del sistema AB0. Por ejemplo, en una muestra se observaron las siguientes frecuencias de los tipos sanguíneos: A = 0,53, B = 0,13 y O = 0,26. Debido a que el alelo I^0 es recesivo, la frecuencia del tipo sanguíneo O en la población es igual a la frecuencia del genotipo recesivo r^2. Así,

$$r^2 = 0{,}26$$
$$r = \sqrt{0{,}26}$$
$$r = 0{,}51$$

Utilizando el valor estimado para r, podemos calcular las frecuencias de los alelos I^A e I^B. El alelo I^A está presente en dos genotipos, I^AI^A y I^AI^0. La frecuencia del genotipo I^AI^A viene representada por p^2 y la de I^AI^0 por $2pr$. Por consiguiente, combinando la frecuencia de los tipos sanguíneos A y 0, tendremos

$$p^2 + 2pr = r^2 = 0{,}53 + 0{,}26$$

Si resumimos el término izquierdo de la ecuación y sumamos los términos de la derecha, obtendremos

$$(p + r)^2 = 0{,}79$$
$$p + r = \sqrt{0{,}79}$$
$$p = 0{,}89 - r$$
$$p = 0{,}89 - 0{,}51 = 0{,}38$$

Habiendo estimado p y r, las frecuencias de los alelos I^A e I^O, podemos estimar ahora la frecuencia del alelo I^B:

$$p + q + r = 1$$
$$q = 1 - p - r$$
$$= 1 - 0{,}38 - 0{,}51$$
$$= 0{,}11$$

Las frecuencias genotípicas y fenotípicas para esta población se resumen en la Tabla 25.3.

Cálculo de las frecuencias para caracteres ligados al X

La ley de Hardy-Weinberg se puede utilizar para calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de caracteres ligados al X, pero necesitamos recordar que en un sistema de determinación del sexo XY, el sexo homogamético (XX) tendrá dos copias de los alelos ligados al X mientras que en el sexo heterogamético (XY) habrá sólo una copia. Así, en los mamíferos, en donde la hembra es XX y el macho XY, la frecuencia de los alelos ligados al X en el conjunto de genes y la frecuencia de los machos que expresan el carácter ligado al X será la misma. Esto es así debido a que los machos tienen sólo un cromosoma X y la probabilidad de que cualquier macho reciba un cromosoma X con el alelo en cuestión tiene que ser igual a la frecuencia del alelo. La probabilidad de que cualquier hembra tenga el alelo en cuestión en sus dos cromosomas X será q^2, en donde q es la frecuencia del alelo.

Para ilustrar esto para un carácter recesivo ligado al X, consideremos el ejemplo de la ceguera para los colores rojo y verde que afecta a un 8 por ciento en los varones. Por consiguiente, la frecuencia del alelo para la ceguera de los colores es 0,08; en otras palabras, el 8 por ciento de los cromosomas X lo llevan. El otro 92 por ciento de los cromosomas X lleva el alelo dominante para la visión normal de los colores rojo y verde. Si p es la frecuencia del alelo normal y q la frecuencia del alelo para la ceguera de los colores, entonces $p = 0{,}92$ y $q = 0{,}08$. La frecuencia de mujeres ciegas para los colores (con los dos cromosomas X afectados) es $q^2 = (0{,}08)^2 = 0{,}0064$, y la frecuencia de las mujeres portadoras (un cromosoma X normal y otro afectado) es $2pq = 2(0{,}92)(0{,}08) = 0{,}147$. Es decir, el 14,7 por ciento de las mujeres llevan el alelo para la ceguera de los colores y pueden pasarlo a sus hijos, aunque ellas mismas tengan visión normal.

Una consecuencia importante de la diferencia en frecuencia alélica para genes ligados al X entre gametos masculinos y femeninos, es que para un alelo recesivo raro, el carácter se expresará con mayor frecuencia entre los individuos XY que entre los que son XX. Así, por ejemplo, enfermedades como la hemofilia o la distrofia muscular de Duchenne en la especie humana, ambas debidas a mutaciones recesivas en el cromosoma X, son mucho más corrientes en chicos, que les basta con heredar una sola copia del alelo mutante para padecer la enfermedad. Las chicas que hereden dos cromosomas X afectados también manifestarán la enfermedad, pero con un alelo raro la probabilidad de que esto ocurra es pequeña. Las mujeres tienen una mayor probabilidad de ser portadoras de caracteres recesivos ligados al X, como vimos anteriormente en el ejemplo de la ceguera para los colores.



El Problema 25.18 de la página 748 le pide que calcule el número de heterozigotos portadores para un carácter ligado al X en una población humana.

Sugerencia: Determine primero el genotipo de los portadores. ¿Qué proporción de la población puede ser potencialmente portadora?

TABLA 25.3 CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA ALELOS MÚLTIPLES, EN DONDE LA FRECUENCIA DEL ALELO I^A ES 0,38, I^B ES 0,11 Y I^O ES 0,51

Genotipo	Frecuencias genotípicas	Fenotipo	Frecuencias fenotípicas
I^AI^A	$p^2 = (0{,}38)^2 = 0{,}14$	A	0,53
I^AI^O	$2pr = 2(0{,}38)(0{,}51) = 0{,}39$		
I^BI^B	$q^2 = (0{,}11)^2 = 0{,}01$	B	0,12
I^BI^O	$2qr = 2(0{,}11)(0{,}51) = 0{,}11$		
I^AI^B	$2pq = 2(0{,}38)(0{,}11) = 0{,}084$	AB	0,08
I^OI^O	$r^2 = (0{,}51)^2 = 0{,}26$	O	0,26

Cálculo de la frecuencia de los heterozigotos

En otra aplicación, la ley de Hardy-Weinberg nos permite estimar la frecuencia de los heterozigotos en una población. La frecuencia de un carácter recesivo raro se puede determinar normalmente contando tales individuos en una muestra de la población. Con esta información y la ley de Hardy-Weinberg, podemos calcular las frecuencias alélicas y genotípicas.

La fibrosis quística, un carácter recesivo autosómico, tiene una incidencia de 1/2.500 = 0,0004 entre personas con ascendencia del norte de Europa. Los individuos con fibrosis quística se distinguen fácilmente de la población debido a síntomas como sudor salado, cantidades excesivas de mucus espeso en los pulmones y susceptibilidad a infecciones bacterianas. Ya que es un carácter recesivo, los individuos con fibrosis quística tienen que ser homozigotos. Su frecuencia en la población será q^2, siempre y cuando el apareamiento en la generación anterior haya sido al azar. Por consiguiente, la frecuencia del alelo recesivo será

$$q = \sqrt{q^2} = \sqrt{0{,}0004} = 0{,}02$$

ya que $p + q = 1$, entonces la frecuencia de p será

$$p = 1 - q = 1 - 0{,}02 = 0{,}98$$

En la ecuación de Hardy-Weinberg, la frecuencia de los heterozigotos es $2pq$. Por ello,

$$\begin{aligned} 2pq &= 2(0{,}98)(0{,}02) \\ &= 0{,}04, \text{ o el 4 por ciento, o } 1/25 \end{aligned}$$

Así, los heterozigotos para la fibrosis quística son bastante comunes en la población (el 4 por ciento), aun cuando la incidencia de los homozigotos recesivos es solo de 1/2.500 = 0,04 por ciento.

En general, las frecuencias de los tres genotipos se pueden estimar una vez que se conozca la frecuencia de ambos alelos y una vez cumplidas las condiciones de Hardy-Weinberg. En la Figura 25.5 se muestran las relaciones entre las frecuencias genotípicas y alélicas. Es importante advertir que los heterozigotos aumentan rápidamente en la población a medida que los valores de p y q se desplazan hacia 0 ó 1. Esto confirma nuestra conclusión de que cuando un carácter recesivo es raro, cómo la fibrosis quística, la mayoría de los que llevan el alelo son heterozigotos. En las poblaciones en las que las frecuencias de p y q se encuentran entre 0,33 y 0,67, los heterozigotos están en mayor frecuencia que cualquiera de los dos homozigotos.

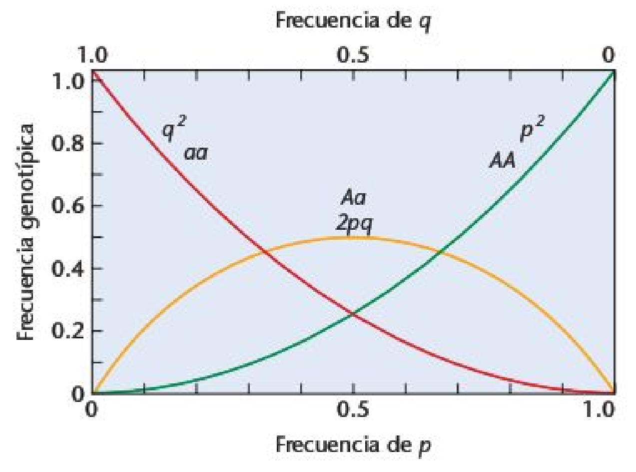


FIGURA 25.5 Relaciones entre las frecuencias genotípicas y alélicas de acuerdo con la ecuación de Hardy-Weinberg.

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.17 de la página 748 se le pide que calcule la frecuencia de los portadores heterozigotos del carácter recesivo albinismo en poblaciones humanas.

Sugerencia: Determine primero cómo calcular la frecuencia del alelo albino en esta población.

25.5 La selección natural es la fuerza principal que impulsa los cambios de las frecuencias alélicas

Ya advertimos que la ley de Hardy-Weinberg establece una población ideal que nos permite estimar las frecuencias alélicas y genotípicas en un locus dado en poblaciones en la que se mantienen las condiciones de apareamiento al azar, ausencia de selección y mutación e igual viabilidad y fecundidad. Obviamente, es difícil encontrar poblaciones naturales en las que se cumplan estas condiciones para todos los loci. En la naturaleza, las poblaciones son dinámicas y son corrientes los cambios de tamaño y del conjunto de genes. Esta situación nos permite utilizar la ley de Hardy-Weinberg para investigar poblaciones que varían de la ideal. En esta y en las siguientes secciones discutiremos los factores que evitan que las poblaciones alcancen el equilibrio de Hardy-Weinberg, o que conduzcan a las poblaciones hacia un equilibrio diferente, y la contribución relativa de estos factores al cambio evolutivo.

Selección natural

La primera condición de la ley de Hardy-Weinberg es que los individuos de cualquier genotipo tienen iguales tasas de supervivencia e igual éxito reproductivo. Si esta condición no se cumple, las frecuencias alélicas pueden cambiar de una generación a la siguiente. Para ver cómo, imaginemos una población de 100 individuos, en la que la frecuencia del alelo A es 0,5 y la del alelo a es 0,5. Suponiendo que la generación anterior se haya cruzado aleatoriamente, encontramos que las frecuencias genotípicas en la generación actual son $(0{,}5)^2 = 0{,}25$ para AA, $2(0{,}5)(0{,}5) = 0{,}5$ para Aa y $(0{,}5)^2 = 0{,}25$ para aa. Debido a que nuestra población tiene 100 individuos, tendremos 25 individuos AA, 50 individuos Aa y 25 individuos aa. Supongamos ahora que los individuos con distintos genotipos tienen tasas de

supervivencia diferentes: sobreviven para reproducirse los 25 individuos *AA*, el 90 por ciento, o 45, de los individuos *Aa*, y el 80 por ciento, o 20, de los individuos *aa*. Cuando los supervivientes se reproduzcan, cada uno contribuirá con dos gametos al nuevo conjunto de genes, lo que nos da 2(25) + 2(45) + 2(20) = 180 gametos. ¿Cuál será la frecuencia de los dos alelos en la población que sobrevive? Tendremos 50 gametos *A* de los individuos *AA*, más 45 gametos *A* de los individuos *Aa*, por lo que la frecuencia del alelo *A* será (50+45)/180 = 0,53. Tendremos 45 gametos *a* de los individuos *Aa* más 40 gametos *a* de los individuos *aa*, por lo que la frecuencia del alelo *a* será (45+40)/180 = 0,47.

Estas difieren de las frecuencias iniciales. El alelo *A* ha aumentado mientras que el alelo *a* ha disminuido. La diferencia entre los individuos en cuanto a la supervivencia o tasa de reproducción (o de ambas) se denomina selección natural. La selección natural es la fuerza principal que desplaza las frecuencias alélicas en poblaciones grandes y es uno de los factores más importantes del cambio evolutivo.

Eficacia biológica y selección

La selección se produce siempre que los individuos con un genotipo concreto gocen de una ventaja en supervivencia o reproducción respecto de otros genotipos. Sin embargo la selección puede variar desde menos del 1 por ciento hasta el 100 por ciento en el caso de genes letales. En el ejemplo anterior, la selección era fuerte. La selección débil podría implicar solo a una fracción de una diferencia porcentual en las tasas de supervivencia de genotipos distintos. Las ventajas en supervivencia y reproducción se traducen finalmente en una contribución genética aumentada en generaciones futuras. La contribución genética de un individuo a generaciones futuras se denomina su **eficacia biológica**. Así, los genotipos asociados con tasas altas de éxito reproductivo se dice que tienen una elevada eficacia biológica, mientras que los genotipos asociados con éxito reproductivo bajo se dice que tienen baja eficacia biológica.

El análisis de Hardy-Weinberg también nos permite examinar la eficacia biológica. Por convención, los genéticos de poblaciones utilizan la letra w para representar la eficacia biológica. Así, w_{AA} representa la eficacia relativa del genotipo *AA*, w_{Aa} la del genotipo *Aa* y w_{aa} la del genotipo *aa*. Por ejemplo, asignando los valores $w_{AA} = 1$, $w_{Aa} = 0{,}9$ y $w_{aa} = 0{,}8$ estamos diciendo que sobreviven todos los individuos *AA*, el 90 por ciento de los *Aa* y el 80 por ciento de los *aa*, como en el ejemplo anterior.

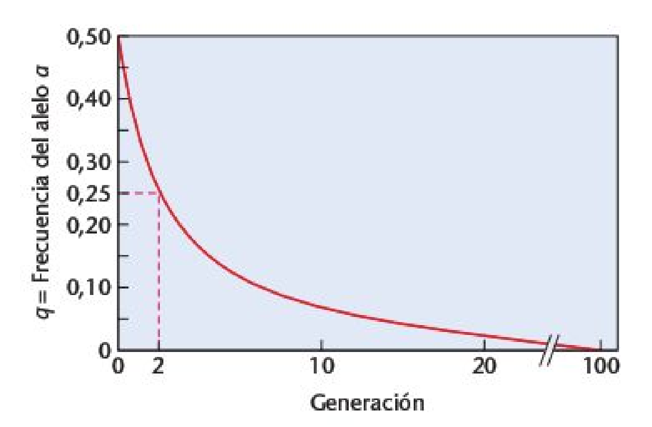
Consideremos la selección contra un alelo deletéreo. Los valores de eficacia $w_{AA} = 1$, $w_{Aa} = 1$ y $w_{aa} = 0$ describen una situación en la que *a* es un alelo letal en homozigosis. Como los individuos homozigotos recesivos mueren sin dejar descendencia, la frecuencia del alelo *a* disminuirá. El declive de la frecuencia del alelo *a* se describe con la ecuación

$$q_g = \frac{q_0}{1 + gq_0}$$

en donde q_g es la frecuencia del alelo *a* en la generación *g*, q_0 es la frecuencia inicial de *a* (es decir, la frecuencia de *a* en la generación cero) y *g* es el número de generaciones que han transcurrido.

La Figura 25.6 muestra lo que sucede a un alelo recesivo letal con una frecuencia inicial de 0,5. Al principio, debido al alto porcentaje de los genotipos *aa*, la frecuencia del alelo *a* disminuye rápidamente. La frecuencia de *a* se reduce a la mitad en sólo dos generaciones. En la sexta generación la frecuencia se ha reducido de nuevo a la mitad. Sin embargo, a partir de ese momento, la mayoría de los alelos *a* se encuentran en los heterozigotos. Como *a* es recesivo, estos heterozigotos no serán seleccionados. Esto quiere decir que cuanto más tiempo pase, la frecuencia del alelo *a* irá disminuyendo cada vez más lentamente. Mientras que los heterozigotos continúen cruzándose, es difícil para la selección eliminar completamente de la población a un alelo recesivo.

Desde luego, un alelo deletéreo no tiene porque ser recesivo; son posibles otras muchas situaciones. Un alelo deletéreo puede



Generación	*p*	*q*	p^2	*2pq*	q^2
0	0,50	0,50	0,25	0,50	0,25
1	0,67	0,33	0,44	0,44	0,12
2	0,75	0,25	0,56	0,38	0,06
3	0,80	0,20	0,64	0,32	0,04
4	0,83	0,17	0,69	0,28	0,03
5	0,86	0,14	0,73	0,25	0,02
6	0,88	0,12	0,77	0,21	0,01
10	0,91	0,09	0,84	0,15	0,01
20	0,95	0,05	0,91	0,09	$<0{,}01$
40	0,98	0,02	0,95	0,05	$<0{,}01$
70	0,99	0,01	0,98	0,02	$<0{,}01$
100	0,99	0,01	0,98	0,02	$<0{,}01$

FIGURA 25.6 Cambio de la frecuencia de un alelo letal recesivo, *a*. La frecuencia de *a* se reduce a la mitad en dos generaciones, y se reduce a la cuarta parte en seis generaciones. Reducciones posteriores se dan lentamente debido a que la mayoría de los alelos *a* se encuentran en los heterozigotos.

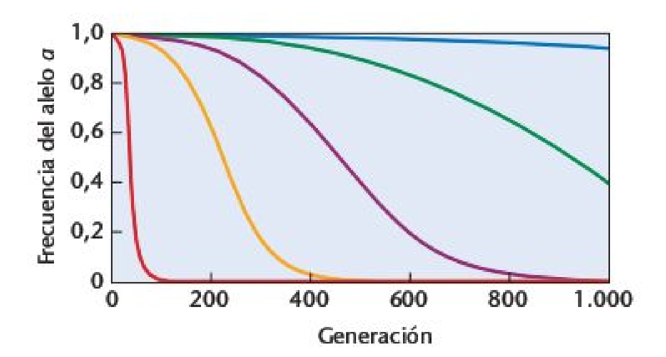
ser codominante, de tal manera que los heterozigotos tengan una eficacia intermedia. O puede ser deletéreo en homozigosis, pero beneficioso en heterozigosis, como el alelo de la anemia falciforme. La Figura 25.7 muestra ejemplos en los que un alelo deletéreo es codominante, pero la intensidad de la selección varía de fuerte a débil. En cada caso, la frecuencia del alelo deletéreo *a* se inicia a 0,99 y declina con el tiempo. Sin embargo, el ritmo de declive depende mucho de la fuerza de la selección. Cuando solo el 90 por ciento de los heterozigotos y el 80 por ciento de los homozigotos *aa* sobrevive (curva roja), la frecuencia del alelo a disminuye de 0,99 a menos del 0,01 en 85 generaciones. Sin embargo, cuando el 99,8 por ciento de los heterozigotos y el 99,6 por ciento de los homozigotos *aa* sobrevive (curva azul) se tardan 1.000 generaciones para que la frecuencia del alelo a caiga de 0,99 a 0,93. De este gráfico se pueden extraer dos conclusiones importantes. Primero, dadas miles de generaciones, incluso la selección más débil puede dar lugar a cambios sustanciales de las frecuencias alélicas; ya que la evolución se produce normalmente a lo largo de muchas generaciones, la selección es una poderosa fuerza evolutiva. Segundo, para que la selección produzca cambios rápidos en las frecuencias alélicas, cambios cuantificables dentro de la duración de la vida humana, las diferencias en eficacia entre los genotipos tienen que ser grandes, o el tiempo de generación tiene que ser corto.

La forma en cómo la selección afecta a las frecuencias alélicas, nos permite hacer algunas deducciones acerca del alelo *CCR5-Δ32* que discutimos anteriormente. Debido a que los individuos con genotipo *Δ32/Δ32* son resistentes a la mayoría de las cepas de VIH-1 transmitidas sexualmente, mientras que los individuos con genotipos *1/1* y *1/Δ32* son susceptibles, podríamos esperar que el SIDA actuara como fuerza selectiva provocando que la frecuencia del alelo *Δ32* aumentara con el tiempo. Realmente será probable, pero el aumento en frecuencia es lento en términos humanos.

Podemos hacer un cálculo aproximado como sigue: imagine una población en la que la frecuencia del alelo *Δ32* es 0,1. En las condiciones de Hardy-Weinberg, las frecuencias genotípicas de esta población son 0,81 para *1/1*, 0,18 para *1/Δ32* y 0,01 para *Δ32/Δ32*. Imagine también que el 1 por ciento de los individuos *1/1* y *1/Δ32* contrae el VIH y muere de SIDA.

Basándonos en nuestros supuestos, podemos asignar niveles de eficacia a los genotipos como sigue: $w_{1/1} = 0{,}99$; $w_{1/\Delta 32}$ y $= 0{,}99$; $w_{\Delta 32/\Delta 32} = 1$. Dada la eficacia asignada, podemos predecir que la frecuencia del alelo *CCR5-Δ32* en la próxima generación será 0,100091. De hecho, se tardarán 100 generaciones (unos 2.000 años) para que la frecuencia del alelo *Δ32* alcance exactamente el 0,11 (Figura 25.8). En otras palabras, la frecuencia del alelo probablemente no cambiará mucho en las siguientes generaciones en la mayoría de las poblaciones en donde normalmente se encuentra. Una perspectiva de genética de poblaciones arroja luz en la historia del *CCR5-Δ32* también en otros aspectos. Dos grupos de investigación han analizado la variación genética en loci marcadores íntimamente ligados al gen *CCR5*. Ambos grupos concluyeron que la mayoría, si no todas, las copias actuales del alelo *Δ32* descienden de una sola copia ancestral que apareció en el noreste de Europa hace, como mucho, unos pocos miles de años. De hecho un grupo estima que el ancestro común de todos los alelos *Δ32* apareció hace exactamente 700 años. ¿Cómo pudo aumentar un alelo nuevo desde una frecuencia prácticamente cero al 20 por ciento en unas 30 generaciones?

Parece que se debió a una fuerte selección a favor del alelo *Δ32*, muy probablemente en forma de una enfermedad infecciosa. El agente selectivo no pudo ser el VIH-1, porque éste se ha desplazado de los chimpancés a los humanos hace demasiado



Selección contra el alelo *a*					
	Fuerte ←				→ Débil
	roja	amarilla	morada	verde	azul
w_{AA}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
w_{Aa}	0,90	0,98	0,99	0,995	0,998
w_{aa}	0,80	0,96	0,98	0,99	0,996

FIGURA 25.7 Efecto de la selección sobre las frecuencias alélicas. El ritmo al que se elimina un alelo deletéreo de una población depende de la fuerza de la selección.

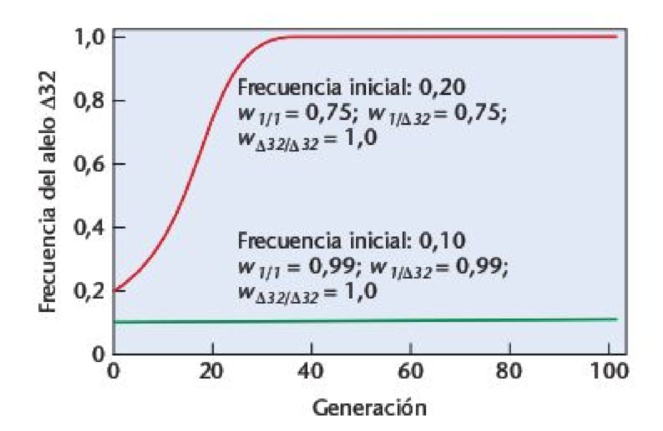


FIGURA 25.8 Ritmo al que la frecuencia del alelo *CCR5-Δ32* cambia en poblaciones hipotéticas con diferentes frecuencias iniciales y eficacias distintas.

poco. Debido a que la selección actuó hace unos 700 años, J.C. Stephens sugiere que el agente selectivo fue la peste bubónica. Durante la Peste Negra de 1346-1352, murió entre un cuarto y un tercio de la población europea. La peste bubónica la produce la bacteria *Yersinia pestis*. Esta bacteria fabrica una proteína que mata a algunos tipos de leucocitos. Stephens supone que el proceso durante el que la bacteria mata a algunos los leucocitos implica al producto del gen *CCR5*. Si esto es así, algún mecanismo hizo que los individuos homozigotos para el alelo *Δ32* tuvieran mayor probabilidad de sobrevivir a la plaga.

Basado en su estudio del locus *CCR5* en poblaciones judías y europeas, William Klitz y sus colegas han sugerido que el alelo *Δ32* pudo haber aparecido ya en el siglo VIII. También sugieren que la viruela pudo ser el agente selectivo responsable del rápido incremento en frecuencia de este alelo. Tanto el VIH como la viruela utilizan el receptor CCR5 para infectar a las células y con una tasa de mortalidad del 25 por ciento, oleadas de viruela serían unos agentes selectivos poderosos.

Si epidemias pasadas son responsables de la elevada frecuencia del alelo *CCR5-Δ32* en las poblaciones europeas, entonces la virtual ausencia del alelo en poblaciones no europeas es al principio algo sorprendente. Quizás las plagas han sido más frecuentes en Europa que en cualquier otra parte. Alternativamente, quizás otras poblaciones tienen alelos distintos del gen *CCR5* que también confieran protección contra la plaga. Grupos de investigación buscando otros alelos del gen *CCR5* en distintas poblaciones han encontrado un total de 20 alelos mutantes, incluido el *Δ32*. Dieciséis de estos alelos codifican proteínas diferentes en estructura de la codificada por el alelo *CCR5-1*. Otros, como el *Δ32*, son alelos de pérdida de función. Algunos de los alelos parecen confinados a poblaciones asiáticas, otros a poblaciones africanas. Sus frecuencias se encuentran entre el 3 y el 4 por ciento. En conjunto, estos descubrimientos están de acuerdo con la hipótesis de que la alteración o pérdida de la proteína CCR5 protege contra una o varias enfermedades infecciosas no identificadas todavía.

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.8 de la página 748 se le pide que calcule el efecto, sobre las frecuencias alélicas, de distintos niveles de eficacia en diferentes genotipos

Sugerencia: Calcule primero las frecuencias genotípicas de la generación siguiente.

La selección en poblaciones naturales

Los genéticos han realizado muchas investigaciones sobre el efecto de la selección natural en las frecuencias alélicas, tanto en el laboratorio como en poblaciones naturales. Entre los estudios más detallados en poblaciones naturales están aquellos que se refieren a los insectos sometidos a insecticidas. Por ejemplo, Christine Chevillon y colegas han estudiado el efecto del insecticida clorpirifos sobre las frecuencias alélicas en poblaciones de mosquitos domésticos (Figura 25.9) Los clorpirifos matan a los mosquitos interfiriendo con la función de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), que en condiciones normales destruyen el neurotransmisor acetilcolina. Un alelo de ACE, llamado Ace^R, codifica una versión ligeramente alterada de la ACE que es inmune a la interferencia por clorpirifos.

Chevillon midió la frecuencia del alelo Ace^R en nueve poblaciones. En las cuatro primeras localidades se habían utilizado clorpirifos para el control de los mosquitos durante 22 años, en las cinco restantes nunca se habían utilizado. Chevillon predijo que la frecuencia de Ace^R sería más alta en las poblaciones expuestas. Los investigadores también predijeron que las frecuencias de los alelos para las enzimas no relacionadas con los efectos fisiológicos de los clorpirifos no presentarían tal patrón. Entre las enzimas control estudiadas estaba la aspartato amino transferasa 1. Los resultados aparecen en la Figura 25.10. Como los investigadores predijeron, la frecuencia del alelo Ace^R fue significativamente más alta en las poblaciones expuestas. También, como predijeron, la frecuencia de los alelos más comunes del gen que controla la enzima no mostraba tal tendencia. La explicación es que durante los 22 años de exposición a los insecticidas, los mosquitos tenían tasas superiores de supervivencia si llevaban el alelo Ace^R. En otras palabras, el alelo Ace^R había estado favorecido por selección natural.

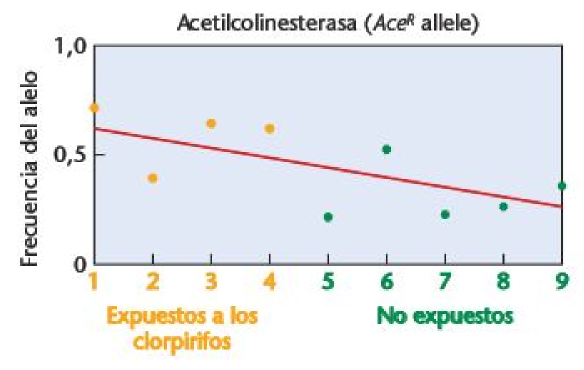
En el caso de las poblaciones de mosquitos expuestas a clorpirifos, la tasa de cambio de las frecuencias alélicas en el locus ACE dependerá de la intensidad de la selección contra los mosquitos que no tienen el alelo Ace^R. Si la selección actúa contra un alelo en la población con una frecuencia inicial q, la nueva



FIGURA 25.9 Los insecticidas utilizados en el control de insectos actúan como agentes selectivos, cambiando las frecuencias alélicas de los genes para la resistencia en las poblaciones expuestas al insecticida.



Mosquito doméstico, *Culex pipiens*.



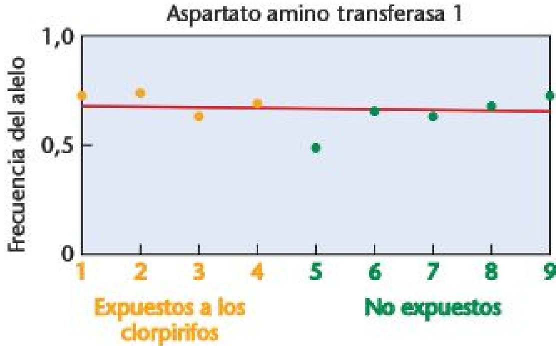


FIGURA 25.10 Efecto de la selección sobre las frecuencias alélicas en poblaciones naturales. (a) La frecuencia del alelo Ace^R, que confiere resistencia al insecticida clorpirifos, es elevada en las poblaciones de mosquito expuestas a clorpirifos. (b) La frecuencia de un alelo de una enzima no relacionada con el metabolismo de los clorpirifos (aspartato amino transferasa 1) no presenta tal patrón.

frecuencia q' después de una generación se puede calcular utilizando la ecuación siguiente:

$$q' = \frac{q(1 - sq)}{1 - sq^2}$$

en donde s es el coeficiente de selección contra los individuos homozigotos para q. Así, si la eficacia de los mosquitos que no tiene el alelo Ace^R y que no son resistentes a los clorpirifos es de 0,75 y la frecuencia inicial de la versión no mutada del alelo ACE es 0,95, entonces, después de una generación de exposición al insecticida, la nueva frecuencia q' del alelo normal será:

$$q' = \frac{0{,}95(1 - 0{,}25 \times 0{,}95)}{1 - 0{,}25 \times 0{,}95^2} = 0{,}935$$

Esto demuestra que incluso con una selección relativamente fuerte a su favor, el nuevo alelo que se encuentra en baja frecuencia necesitará muchas generaciones para dar lugar a un cambio significativo en el conjunto de genes.

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.23 de la página 749 se le pide que calcule el cambio en frecuencia de un alelo resistente en una población de insectos que se alimenta con un maíz transgénico.

Sugerencia: Comience contestando estas cuestiones: ¿Qué alelo está siendo seleccionado en contra? ¿Cuál es la eficacia relativa de los individuos homozigotos para dicho alelo? ¿Cuál es el coeficiente de selección?

Selección natural y caracteres cuantitativos

Como vimos en el Capítulo 24, muchos caracteres están controlados no por alelos de un solo locus, sino que son cuantitativos: El fenotipo es el resultado de la influencia combinada del genotipo de los individuos de muchos loci distintos y el ambiente. La selección que actúa sobre estos caracteres cuantitativos se puede clasificar en (1) direccional, (2) estabilizadora o (3) disruptiva.

En la **selección direccional** son seleccionados los genotipos que confieren fenotipos extremos, dando lugar a un cambio en la media poblacional con el tiempo. Esta forma de selección se practica mucho en mejora vegetal y animal. Si el carácter es poligénico, los fenotipos más extremos que el genotipo puede expresar aparecerán en la población solo después de selección prolongada. Un ejemplo de un experimento de larga duración de selección direccional artificial es el estudio del alto y bajo contenido en aceite en el maíz, llevado a cabo en el State Agricultural Laboratory de Ilinois, descrito en el Capítulo 24.

En la naturaleza, la selección direccional se puede producir cuando uno de los fenotipos extremos se selecciona a favor o en contra, normalmente como consecuencia de cambios ambientales. Un ejemplo cuidadosamente documentado es la investigación de Peter y Rosemary Grant y sus colegas, que utilizaron el pinzón terrestre de tamaño medio (*Geospiza fortis*) de la isla Daphne Major del archipiélago de los Galápagos. El tamaño del pico de estas aves varía mucho. Por ejemplo, en 1976 algunas aves de la población tenían picos de menos de 7 mm de altura, mientras que otros picos tenían más de 12 mm. El tamaño del pico es heredable, lo que significa que padres con picos grandes tienden a tener hijos con pico grandes y que padres con picos pequeños tienden a tener hijos con pico pequeños. En 1977 una grave sequía en Daphne mató a un 80 por ciento de los pinzones. Las aves con picos grandes sobrevivieron en mayor frecuencia que las aves con picos pequeños, ya que cuando el alimento es escaso, las aves con picos grandes pudieron comer una gran variedad de semillas. Cuando finalizó

la sequía en 1978 y los supervivientes se aparearon y criaron, los descendientes heredaron los picos grandes de sus padres. Entre 1976 y 1978 la altura media del pico de los pinzones de la población de Daphne Major aumentó justo por enzima de los 0,5 mm, desplazando el tamaño medio del pico hacia un fenotipo extremo.

Por otro lado, la **selección estabilizadora** tiende a favorecer a los tipos intermedios, siendo seleccionados en contra los dos fenotipos extremos. Con el tiempo, esto reducirá la varianza de la población, pero sin una desviación significativa de la media. Una de las demostraciones más claras de selección estabilizadora lo proporcionan los datos de Mary Karn y de Sheldon Penrose sobre el peso y la supervivencia del recién nacido en 13.730 niños nacidos durante un periodo de 11 años. En la Figura 25.11 se muestra la distribución del peso de los recién nacidos, y el porcentaje de mortalidad a las cuatro semanas de nacer. La mortalidad infantil aumenta espectacularmente a ambos lados del peso óptimo, que es de 3,5 kilos al nacer, y de una manera muy importante en el extremo bajo. En el ámbito genético, la selección estabilizadora actúa manteniendo a la población bien adaptada a su ambiente. En esta situación, los individuos más próximos a la media de un carácter dado, tendrán una mayor eficacia.

La **selección disruptiva** actúa contra los intermedios y a favor de los dos fenotipos extremos. Puede considerarse como opuesta a la selección estabilizadora debido a que actúa contra los tipos intermedios. Esto dara lugar a una población con una distribución bimodal para el carácter, como se puede ver en la Figura 25.12. En una serie de experimentos, John Thoday aplicó selección disruptiva a una población de *Drosophila* en cuanto al número de quetas. En cada generación permitió que solo las moscas con muchas quetas y con pocas quetas se cruzaran. Después de varias generaciones muchas de las moscas podían situarse fácilmente en las categorías de alto o bajo número de quetas (Figura 25.13). Tal situación podría existir en poblaciones naturales, en un ambiente heterogéneo.

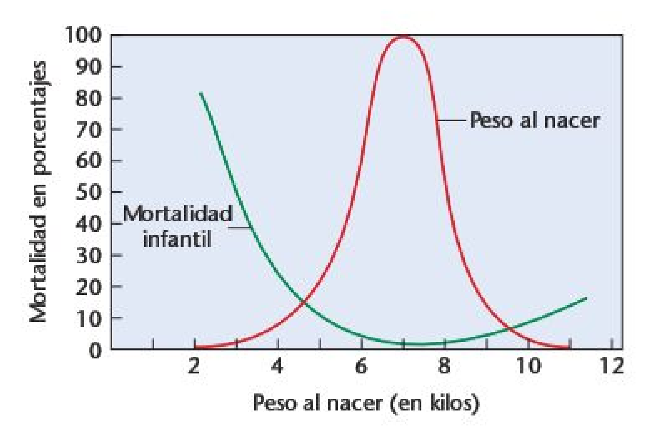


FIGURA 25.11 Relaciones entre el peso al nacimiento y la mortalidad en la especie humana.

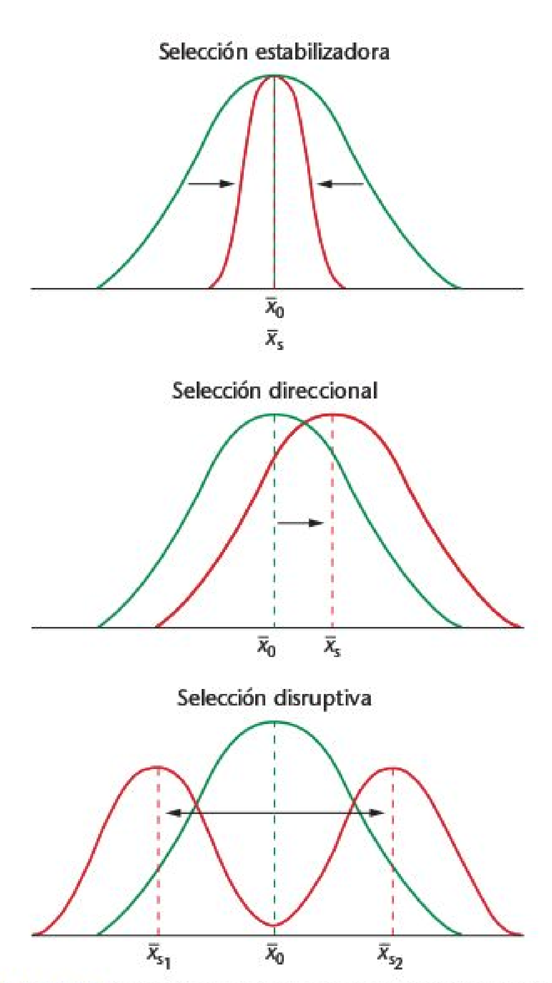


FIGURA 25.12 Impacto de las selecciones estabilizadora, direccional y disruptiva. En cada caso se muestra la media de una población original (en verde) y de la población después de la selección (en rojo).

25.6 La mutación da lugar a nuevos alelos en el conjunto de genes

En una población, el conjunto de los genes se mezcla en cada generación para dar lugar a nuevas combinaciones genotípicas en los descendientes. Debido a que el número de combinaciones genotípicas posibles es tan enorme, los miembros de una población solo presentan, en un momento dado, una fracción de todos los genotipos posibles. La enorme reserva genética presente en el conjunto de genes permite que la transmisión mendeliana independiente y la recombinación produzcan nuevas combinaciones genotípicas continuamente. Pero estos procesos no dan lugar a nuevos alelos. Únicamente la mutación da lugar a nuevos alelos. Es importante tener en cuenta que la mutación ocurre al azar —es decir, sin considerar ningún posible efecto beneficioso o desventajoso para los organismos. En esta sección consideraremos si la mutación, por sí misma, es un factor significativo en dar lugar al cambio de las frecuencias alélicas.

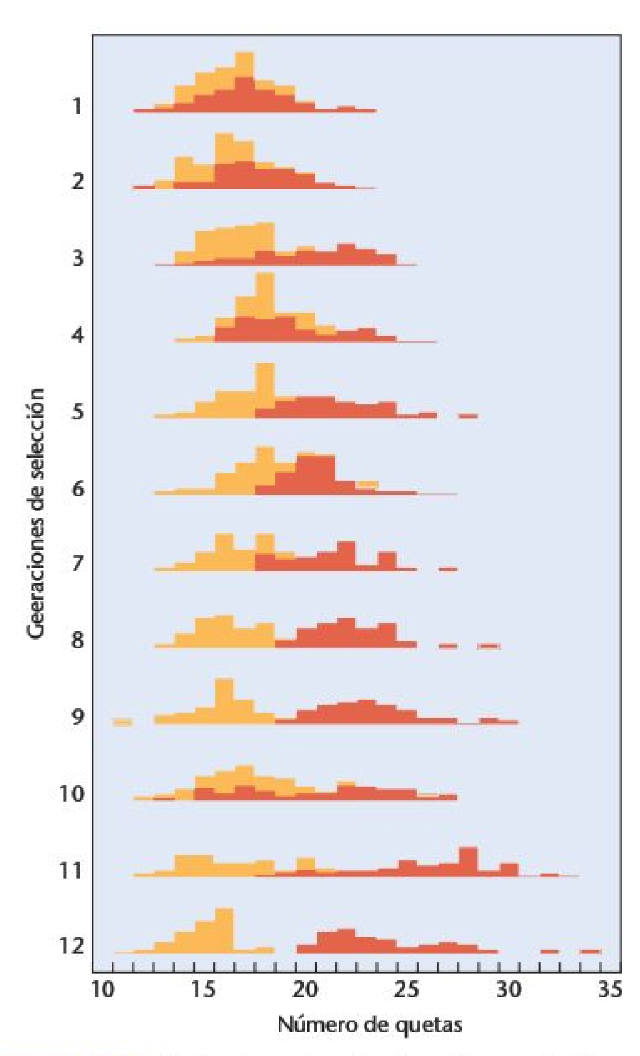


FIGURA 25.13 Efecto de la selección disruptiva en el número de quetas de *Drosophila*. Al seleccionar moscas con el mayor y menor número de quetas, la población presentó una divergencia no solapante en solo 12 generaciones.

Para determinar si la mutación es una fuerza significativa para cambiar las frecuencias alélicas, tenemos que medir la tasa a la que se producen las mutaciones. Como la mayoría de las mutaciones son recesivas, en organismos diploides es difícil observar las tasas de mutación directamente. Se deben emplear métodos indirectos utilizando la probabilidad y la estadística o programas de análisis a gran escala. Sin embargo, para ciertas mutaciones dominantes, se puede utilizar un método directo de medida. Para asegurar su exactitud, se deben cumplir ciertas condiciones.

1. El alelo debe producir un fenotipo diferente que se pueda distinguir de otros fenotipos similares producidos por alelos recesivos.
2. El carácter debe expresarse totalmente o tener penetración completa para que puedan identificarse los individuos mutantes.
3. Agentes no genéticos, como medicamentos o sustancias químicas, nunca deben producir un fenotipo idéntico.

Las tasas de mutación se pueden expresar como el número de nuevos alelos mutantes por número de gametos dado. Suponga que un gen dado sufre mutación a un alelo dominante, manifestando el fenotipo mutante 2 de cada 100.000 nacidos. En estos dos casos, los padres son fenotípicamente normales. Debido a que los zigotos que dan lugar a estos nacimientos llevan cada uno dos copias del gen, realmente hemos analizado 200.000 copias del gen (o 200.000 gametos). Sí asumimos que los afectados son heterozigotos, hemos descubierto 2 alelos mutantes de 200.000. Por ello, la tasa de mutación es 2/200.000 o 1/100.000, que en notación científica se escribiría 1×10^{-5}. En la especie humana, se conoce una forma dominante del enanismo, la acondroplasia, que cumple los requisitos presentados anteriormente para la medición de las tasas de mutación. Los individuos que tienen esta anomalía de los huesos, tienen un cráneo agrandado, brazos y piernas cortas y se pueden diagnosticar por examen radiológico al nacer. En un estudio de casi 250.000 nacimientos, se calculó la tasa de mutación (μ) para la acondroplasia en

$$\mu = 1{,}4 \times 10^{-5} \pm 0{,}5 \times 10^{-5}$$

Sabiendo la tasa de mutación, podemos estimar el grado en el que la mutación puede dar lugar al cambio de las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente. Representamos a los alelos normales como *d* y al alelo para la acondroplasia como *D*.

Imagine una población de 500.000 individuos, en la que todos tienen el genotipo *dd*. La frecuencia inicial de *d* es 1 y la frecuencia inicial de *D* es 0. Si cada individuo contribuye con dos gametos al conjunto de genes, habrá 1,000.000 de gametos, todos con el alelo *d*. Mientras que de los gametos forman el conjunto de genes, 1,4 de cada 100.000 alelos *d* muta al alelo *D*. La frecuencia del alelo *d* es ahora (1,000.000 − 14)/1,000.000 = 0,999986 y la frecuencia de *D* es 14/1,000.000 = 0,000014. De estas cifras, queda claro que pasará mucho tiempo antes de que la mutación, por sí misma, de lugar a un cambio apreciable en las frecuencias alélicas de esta población.

En general, si tenemos dos alelos, *A* con frecuencia *p* y *a* con frecuencia *q*, y si μ es la tasa de mutación que convierte al alelo *A* en el *a*, entonces las frecuencias de los alelos en la generación siguiente viene dada por

$$p_{g+1} = p_g - \mu p_g \quad \text{y} \quad q_{g+1} = q_g + \mu p_g$$

en donde p_{g+1} y q_{g+1} son las frecuencias alélicas de la generación siguiente y p_g y q_g las frecuencias alélicas de la generación actual.

En la Figura 25.14 se muestra la tasa de sustitución (cambio con el tiempo) del alelo *A* para una población en la que la frecuencia inicial de *A* es 1 y la tasa de mutación (μ) que convierte a *A* en *a* es 1×10^{-5}. Con esta tasa de mutación se tar-

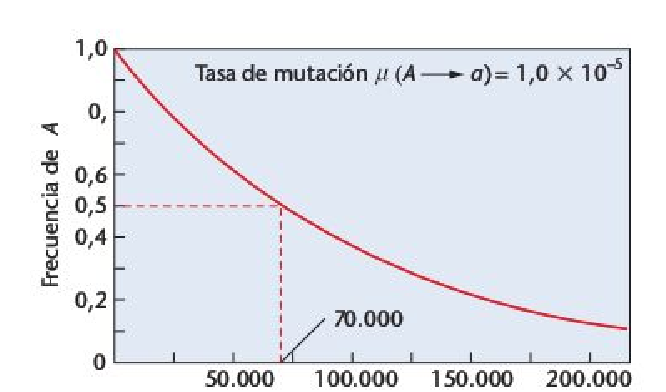


FIGURA 25.14 Tasa de sustitución de un alelo por mutación, suponiendo una tasa de mutación media de 1×10^{-5}.

darían unas 70.000 generaciones para reducir la frecuencia de *A* hasta 0,5. Incluso si la tasa de mutación aumentase por la exposición a niveles elevados de radioactividad o de mutágenos químicos, el impacto de la mutación sobre las frecuencias alélicas será extremadamente débil. Como fuente última de variabilidad genética, la mutación proporciona la materia prima para la evolución, pero *por sí misma* juega un papel relativamente insignificante en el cambio de las frecuencias alélicas. Por el contrario, el destino de los alelos originados por mutación está determinado más probablemente por selección natural (discutida previamente) y por deriva genética (que se discutirá más tarde).

Una perspectiva evolutiva de la mutación puede dar lugar a descubrimientos médicos. La enfermedad recesiva autosómica fibrósis quística, que discutimos anteriormente en relación con el cálculo de las frecuencias de los heterozigotos, es consecuencia de una mutación de pérdida de función en un gen para una proteína de superficie celular llamada reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

La frecuencia de los alelos mutantes que dan lugar a la fibrosis quística es alrededor del 2 por ciento en poblaciones europeas. Hasta hace poco, muchos individuos con dos alelos mutantes morían antes de reproducirse, indicando que la selección contra los individuos homozigotos recesivos era bastante fuerte. Esto dio lugar a un enigma: teniendo en cuenta la selección en contra, ¿qué es lo que mantiene a los alelos mutantes en una frecuencia total del 2 por ciento?

La hipótesis del equilibrio mutación-selección afirma que la mutación está creando constantemente nuevos alelos para sustituir a los que van siendo eliminados por selección. Sin embargo, para que este escenario funcione, la tasa de mutación que da lugar a nuevos alelos tendría que ser bastante alta, del orden de 5×10^{-4} para contrarrestar el efecto de la selección. Muchos genéticos evolutivos prefieren en cambio una explicación alternativa, la hipótesis de la superioridad de los heterozigotos. De acuerdo con la hipótesis de la superioridad de los heterozigotos, la selección en contra de los individuos mutantes homozigotos esta compensada por la selección a favor de los heterozigotos. El agente más popular de selección a favor de los heterozigotos es la resistencia a una enfermedad todavía no identificada.

Trabajos recientes sugieren que los heterozigotos para la fibrosis quística pueden haber incrementado la resistencia a la fiebre tifoidea. La fiebre tifoidea está ocasionada por la bacteria *Salmonella typhi*, que penetra en las células de la pared intestinal. En estudios de laboratorio, células intestinales de ratón heterozigotas para el *CFTR-Δ508*, el análogo más común de la mutación en la especie humana para la fibrosis quística, adquieren un 86 por ciento menos de bacterias que las células homozigotas para el alelo silvestre. Si los heterozigotos para el *CFTR-Δ508* en la especie humana también gozan de resistencia a la fiebre tifoidea todavía hay que demostrarlo. Si son resistentes, entonces la fibrosis quística se unirá a la anemia falciforme como ejemplo de la superioridad de los heterozigotos.

25.7 La migración y el flujo génico puede alterar las frecuencias alélicas

Ocasionalmente, una especie se divide en poblaciones que están separadas geográficamente. Varias fuerzas evolutivas, como la selección, pueden establecer diferentes frecuencias alélicas en tales poblaciones. La **migración** se da cuando los individuos se desplazan entre las poblaciones. Imagine una especie en la que un locus tiene dos alelos, *A* y *a*. Hay dos poblaciones de esta especie, una en el continente y la otra en una isla. La frecuencia de *A* en el continente esta representada por p_m y la frecuencia de *A* en la isla por p_i. A causa de la migración desde el continente a la isla, la frecuencia de *A* en la isla en la generación siguiente ($P_{i'}$) será,

$$P_{i'} = (1 - m)p_i + mp_m$$

en donde *m* representa a los migrantes desde el continente a la isla.

En estas condiciones, la frecuencia de *A* en la generación siguiente en la isla ($P_{i'}$) quedará afectada por la migración. Por ejemplo, supongamos que $p_i = 0{,}4$ y $p_m = 0{,}6$, y que el 10 por ciento de los padres que dan lugar a la siguiente generación son inmigrantes del continente, por lo que $m = 0{,}1$. En la generación siguiente, la frecuencia del alelo *A* en la isla será

$$\begin{aligned} p_{i'} &= [(1 - 0{,}1) \times 0{,}4] + (0{,}1 \times 0{,}6) \\ &= 0{,}36 + 0{,}06 \\ &= 0{,}42 \end{aligned}$$

En este caso, la migración desde el continente ha cambiado la frecuencia de *A* en la isla de 0,40 a 0,42 en una sola generación.

Si *m* es grande o si p_m es muy diferente de p_i, entonces en una sola generación se dará un cambio bastante grande de la frecuencia de *A*. Si la migración es la única fuerza que está actuando para cambiar las frecuencias alélicas de la isla, entonces

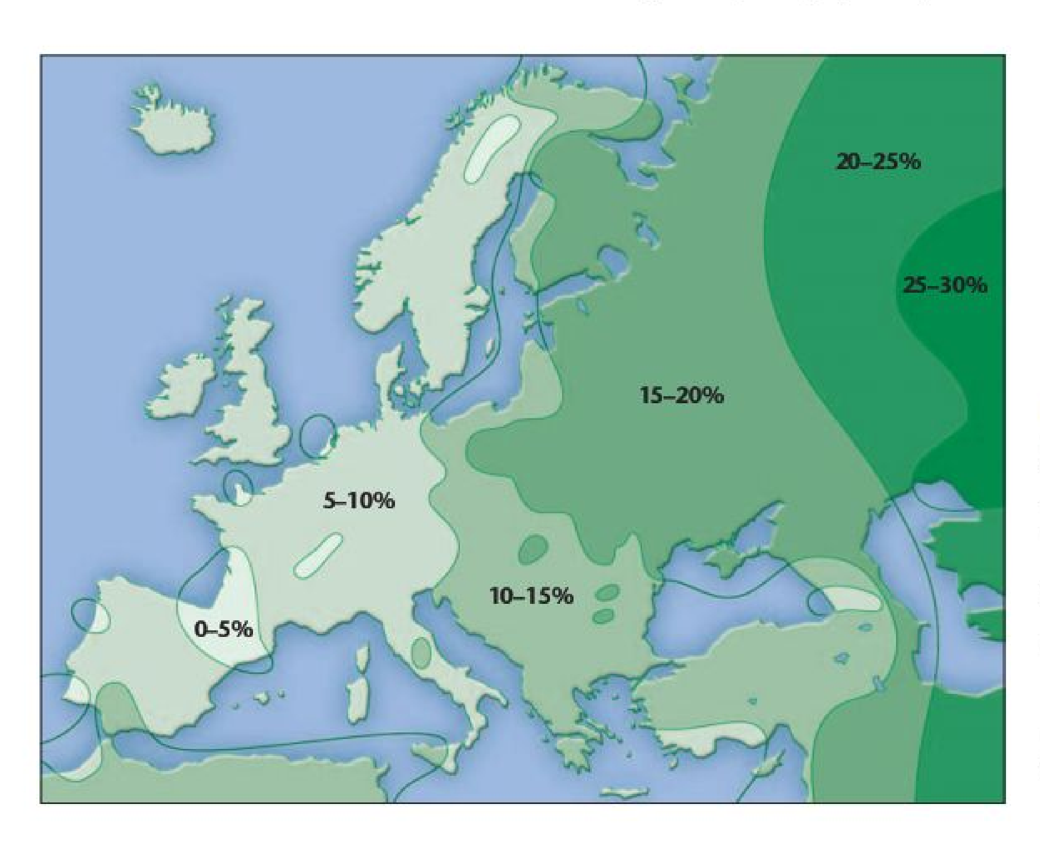


FIGURA 25.15 La migración como fuerza evolutiva. La frecuencia del alelo *B* del locus *ABO* presenta un gradiente de este a oeste. Este alelo tiene su mayor frecuencia en Asia central y disminuye hasta alcanzar su menor frecuencia en el nordeste de España. Este gradiente sigue las olas de migraciones mongolas hacia Europa después de la caída de Imperio Romano, y es una reliquia genética de la historia de la humanidad.

se alcanzará un equilibrio sólo cuando $p_i = p_m$. Estos cálculos revelan que el cambio en frecuencia alélica atribuible a la migración es proporcional a las diferencias en frecuencias alélicas entre las poblaciones donante y receptora y a la tasa de migración. Como *m* puede tener un rango de valores muy amplio, el efecto de la migración puede alterar sustancialmente las frecuencias alélicas en las poblaciones, como se muestra para el alelo *B* del grupo sanguíneo humano AB0 de la Figura 25.15. Aunque la migración puede ser difícil de cuantificar, a menudo se puede estimar.

La migración también se puede considerar como un flujo de genes entre poblaciones que una vez estuvieron geográficamente aisladas pero que ya no lo están. Esteban Parra y colegas han medido las frecuencias alélicas para varias secuencias polimórficas diferentes de DNA en poblaciones afro-americanas y euro-americanas que representan a las poblaciones ancestrales de las cuales descienden las dos poblaciones americanas. El locus que estudiaron, un lugar de restricción polimórfico llamado *FY-NULL*, tiene dos alelos *FY-NULL*1* y *FY-NULL*2*. En la Figura 25.16 se muestra la frecuencia de *FY-NULL*1* en cada población. La frecuencia de este alelo es 0 en las tres poblaciones africanas y 1 en las tres poblaciones europeas, pero se encuentran entre estos extremos en todas las poblaciones afro-americanas y euro-americanas. La explicación más simple de estos datos es que los genes se han mezclado en las poblaciones americanas con ascendencia predominantemente africana y con ascendencia predominantemente europea. Basándose en el *FY-NULL* y en otros loci, los investigadores estiman que las poblaciones afro-americanas derivan entre el

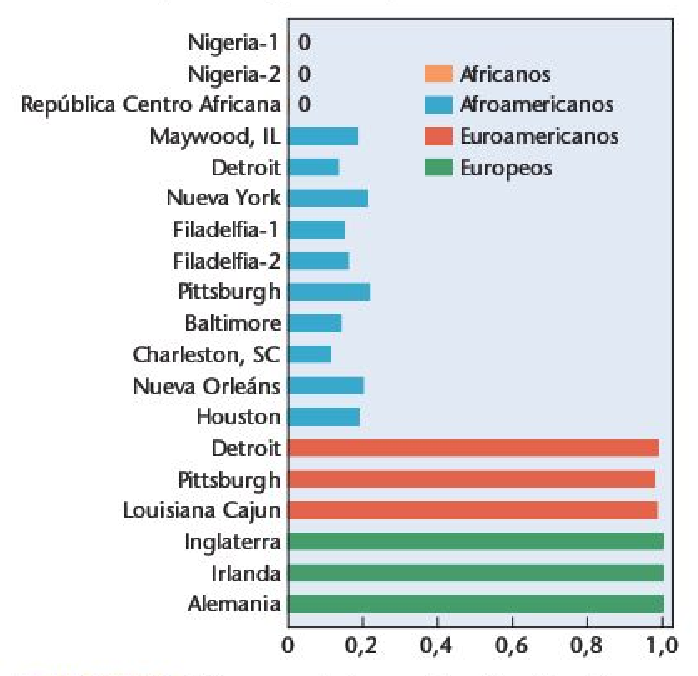


FIGURA 25.16 Histograma de frecuencias del polimorfismo de un alelo de un lugar de restricción en varias poblaciones. Estos y otros datos demuestran que las poblaciones afroamericanas y euroamericanas son de ascendencia mezclada.

11,6 y el 22,5 por ciento de su ascendencia de europeos y las poblaciones euro-americanas derivan entre el 0,5 y el 1,2 por ciento de su ascendencia de africanos.

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.25 de la página 749 se le pide que calcule el cambio en frecuencia de un alelo mutante en una población de carneros de grandes cuernos que se ha incrementado por introducción controlada de individuos de otra población.

Sugerencia: Si los carneros introducidos vienen de una población que no tiene la mutación, ¿se esperaría que la frecuencia del alelo aumentara o disminuyera en la población?

25.8 La deriva genética da lugar a cambios aleatorios de las frecuencias alélicas en poblaciones pequeñas

Se produce deriva genética cuando el número de individuos que se reproducen en una población es demasiado pequeño para asegurar que todos los alelos del conjunto de genes pasarán a la generación siguiente manteniendo sus frecuencias. La deriva se define como el cambio en frecuencia alélica que resulta del muestreo aleatorio de gametos. Para visualizar esto, imagine una población diploide con reproducción sexual con 25 machos y 25 hembras. Aun cuando todos los individuos de la población se reproduzcan como 25 parejas distintas (un escenario improbable en la vida real) el número de gametos que formará el conjunto de genes en la generación siguiente será exactamente 50. Es improbable que tan pequeño número de gametos refleje exactamente la estructura genética de la población paterna. Por ello, ciertos alelos pueden estar más o menos representados en el conjunto de gametos, lo que dará lugar a cambios aleatorios de las frecuencias de una generación a la siguiente. Si consideramos un solo locus con dos alelos, A y a, la deriva genética puede dar lugar a que uno de los alelos desaparezca finalmente, mientras que el otro quedaría fijado —en otras palabras, quedaría como la única versión de dicho gen en el conjunto de genes de la población. Una correlación describe la probabilidad de fijación o de pérdida de un alelo. La probabilidad de que un alelo quede fijado por deriva es igual a su frecuencia inicial. Así, si $p(A) = 0{,}8$, la probabilidad de que A quede fijado es del 0,8, u 80 por ciento; la probabilidad de que A se pierda por deriva es $(1 - 0{,}8) = 0{,}2$, o el 20 por ciento.

Para estudiar la deriva genética en poblaciones de laboratorio de *Drosophila melanogaster*, Warwick Kerr y Sewall Wright fundaron unas 100 líneas, con cuatro machos y cuatro hembras como padres de cada una. Dentro de cada línea la frecuencia del alelo mutante ligado al sexo *forked* (f) y de su alelo silvestre (f^+) era de 0,5. En cada generación se eligieron al azar como padres de la siguiente generación cuatro machos y cuatro hembras. Después de 16 generaciones, en 70 líneas había ocurrido la pérdida de un alelo y la fijación del otro —29 en las que el único alelo presente era *forked* y 41 en las que el alelo de tipo silvestre se había fijado. El resto de las líneas todavía segregaban los dos alelos o se habían perdido. Si la fijación ocurre aleatoriamente, entonces deberían haberse fijado igual número de líneas para cada alelo. De hecho, los resultados experimentales no diferían estadísticamente de la proporción esperada 35:35, demostrándose que los alelos pueden propagarse en una población y eliminar a otros alelos sólo por azar.

¿Cómo se originan poblaciones pequeñas en la naturaleza? Podría ocurrir un desastre natural, como una epidemia, dando lugar a un pequeño número de supervivientes que constituyeran la población. O a partir de una población grande podría emigrar un pequeño grupo, como fundadores, a un nuevo ambiente, como una nueva isla volcánica. Entre los animales y vegetales en peligro de extinción, la pérdida de hábitat da lugar a menudo a pequeñas poblaciones aisladas en donde la pérdida de diversidad genética por deriva puede amenazar la supervivencia a largo plazo de las especies. (Esto se discutirá con más detalle en el Capítulo 27.)

Las frecuencias alélicas en ciertas poblaciones humanas aisladas demuestran mejor el papel de la deriva como fuerza evolutiva en poblaciones naturales. El atolón de Pingelap en el Océano Pacífico occidental (6° lat. N, 160° long. E) fue devastado en el pasado por tifones y hambruna, y hacia 1780 quedaron solo 9 varones supervivientes. Hoy hay poco menos de 2.000 habitantes, y sus linajes se pueden seguir hasta los supervivientes del tifón. Del 4 al 10 por ciento de la población es ciega para los colores desde la infancia. Estas personas están afectadas por una anomalía autosómica recesiva, la **acromatopsia**, que da lugar a defectos oculares, una forma de ceguera para los colores, y formación de cataratas. Este trastorno es extremadamente raro en las poblaciones humanas. Sin embargo, el alelo mutante se encuentra en una frecuencia relativamente alta en la población de Pingelap. Mediante una reconstrucción genealógica se encontró que uno de los supervivientes (unos 30 individuos) era heterozigoto para el trastorno. Si asumimos que fue el único portador en la población fundadora, la frecuencia inicial del gen era de 1/60, ó 0,016. Como promedio, cerca del 7 por ciento de la población actual está afectada (como genotipos homozigotos recesivos), por lo que la frecuencia del alelo en la población actual se ha incrementado hasta el 0,26. La historia de los habitantes de Pingelap la relata Oliver Sacks en su libro *The Island of the Colorblind.*

Otro ejemplo de deriva genética es el de los Dunkers, una pequeña comunidad religiosa aislada que emigró desde las tierras alemanas del Rin hasta Pensilvania. Debido a que sus creencias religiosas no permiten el casamiento con extraños, la población ha crecido solo mediante matrimonios dentro del grupo. Cuando se comparan las frecuencias de los alelos de los grupos sanguíneos ABO y MN, se encuentran diferencias sig-

nificativas entre los Dunkers, la población alemana y la población de los EE.UU. La frecuencia del grupo sanguíneo A entre los Dunkers es de cerca del 60 por ciento, en contraste con el 45 por ciento en las poblaciones alemanas y de los EE.UU. El alelo I^B está prácticamente ausente entre los Dunkers. El grupo sanguíneo M se encuentra casi en el 45 por ciento de los Dunkers, comparado con cerca del 30 por ciento en las poblaciones de los EE.UU. y alemana. Como no hay pruebas de la ventaja selectiva de estos alelos, es evidente que las frecuencias observadas son el resultado de sucesos al azar en una población aislada, relativamente pequeña.

25.9 Los apareamientos no aleatorios cambian las frecuencias genotípicas pero no las frecuencias alélicas

Hemos explorado de qué manera las violaciones de las cuatro primeras condiciones de la ley de Hardy-Weinberg, en forma de selección, mutación, migración y deriva genética, pueden dar lugar a cambios en las frecuencias alélicas. La quinta condición es que los miembros de una población se apareen al azar: en otras palabras, cualquier genotipo tiene igual probabilidad de cruzarse con cualquier otro genotipo de la población. El apareamiento no aleatorio puede dar lugar al cambio de las frecuencias genotípicas de una población. La selección posterior a favor o en contra de ciertos genotipos tiene el potencial de afectar al conjunto de las frecuencias de los alelos que existen, pero es importante advertir que el apareamiento aleatorio *no cambia por sí mismo las frecuencias alélicas*.

El apareamiento no aleatorio se puede dar de dos maneras. En el **apareamiento selectivo positivo** hay más probabilidad de que se crucen los genotipos iguales entre sí que los desiguales. Esto ocurre a menudo en la especie humana: cierto número de estudios han indicado que muchas personas se sienten más atraídas por individuos que se les parecen físicamente (y por consiguiente es más probable que sean también genéticamente similares). El **apareamiento selectivo** negativo ocurre cuando es más probable que genotipos distintos se apareen; algunas especie vegetales tienen sistemas de reconocimiento intrínseco de polen/estigma que evitan la fecundación entre individuos con los mismos alelos en los loci claves. Sin embargo, la forma más corriente de apareamiento no aleatorio que afecta a las frecuencias genotípicas de la población es la **consanguinidad**.

Consanguinidad

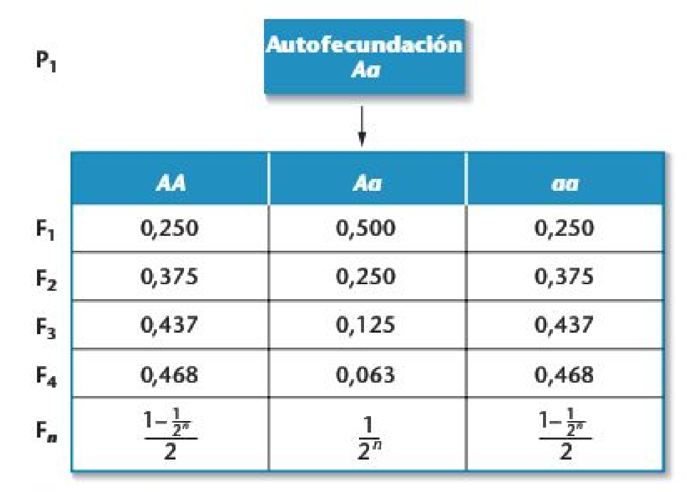
La consanguinidad ocurre cuando los individuos que se cruzan están más emparentados que cualesquiera dos individuos tomados al azar de la población; definida libremente, la consanguinidad es el cruce entre parientes. Para un alelo dado, la consanguinidad aumenta la proporción de homozigotos en la población. Teóricamente, una población totalmente consanguínea constará solo de genotipos homozigotos. Para demostrar esto, consideremos el caso más extremo de consanguinidad, la autofecundación, que aunque rara en animales, está muy extendida en vegetales. En la Figura 25.17 se muestran los resultados de cuatro generaciones de autofecundación, comenzando a partir de un solo individuo heterozigoto para un par de alelos. En la cuarta generación, solo el 6 por ciento de los individuos es todavía heterozigoto y el 94 por ciento restante es homozigoto. Sin embargo, advierta que las frecuencias de *A* y *a* permanecen todavía al 50 por ciento.

No toda la consanguinidad de las poblaciones se produce por autofecundación, ya que hay diferentes grados de consanguinidad. Para describir la intensidad de la consanguinidad en una población, el genético Sewall Wright ideó el coeficiente de consanguinidad (F). El coeficiente, F, cuantifica la probabilidad de que dos alelos de un gen dado de un individuo sean idénticos *porque descienden del mismo alelo de un antecesor*. Si $F = 1$, todos los individuos de la población serán homozigotos y en cada individuo ambos alelos derivarán de la misma copia ancestral. Si $F = 0$, ningún individuo tiene sus dos alelos derivados de la misma copia ancestral.

Un método simple para estimar F en una población se basa en la relación inversa entre consanguinidad y frecuencia de heterozigotos: cuando el nivel de consanguinidad aumenta la frecuencia de heterozigotos disminuye. Por consiguiente, F se puede calcular como

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

en donde H_e es la heterozigosis esperada de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg y H_0 la heterozigosis observada en la población. Advierta que en una población con apareamiento aleatorio, los valores de heterozigosis observados y esperados serán los mismos y $F = 0$.



	AA	*Aa*	*aa*
F_1	0,250	0,500	0,250
F_2	0,375	0,250	0,375
F_3	0,437	0,125	0,437
F_4	0,468	0,063	0,468
F_n	$\frac{1-\frac{1}{2^n}}{2}$	$\frac{1}{2^n}$	$\frac{1-\frac{1}{2^n}}{2}$

FIGURA 25.17 Reducción de la frecuencia de heterozigotos conseguida por autofecundación. Después de *n* generaciones, se pueden calcular las frecuencias de los genotipos de acuerdo con la fórmula de la última fila.

Se puede utilizar un método diferente para estimar la F de un individuo. En la Figura 25.18 se presenta una genealogía de un matrimonio entre primos hermanos. La mujer de la cuarta generación (en rosa) es hija de primos hermanos (en amarillo). Suponga que su bisabuela (en verde) fuera portadora de un alelo letal recesivo, *a*. ¿Cuál es la probabilidad de que la mujer de la cuarta generación herede dos copias del alelo letal de su bisabuela? Para que esto suceda, (1) la bisabuela tiene que pasar una copia del alelo a su hijo, (2) su hijo tiene que pasarlo a su hija y (3) su hija tiene que pasarlo a la suya (la mujer rosa). También, (4) la bisabuela tiene que pasar una copia del alelo a su hija, (5) su hija lo tiene que pasar a su hijo y (6) su hijo lo tiene que pasar a su hija (la mujer rosa). Cada uno de los seis sucesos necesarios tiene una probabilidad de 1/2, y *todos* tienen que darse, por lo que la probabilidad de que la mujer rosa herede dos copias del alelo letal de su bisabuela es $(1/2)^6 = 1/64$. Para calcular el valor de F de la mujer rosa como hija de un matrimonio entre primos hermanos, recuerde que ella puede heredar dos copias de cualquiera de los otros tres alelos presentes en sus bisabuelos. Ya que cualquiera de la cuatro posibilidades daría lugar a que la mujer rosa tuviera los dos alelos idénticos por descendencia de una copia ancestral,

$$F = 4 \times (1/64) = 1/16.$$

Ahora resuelva esto

En el Problema 25.22 de la página 748 se le pide que calcule el coeficiente de consanguinidad de una población basándose en los datos de un marcador de DNA.

Sugerencia: Primero, calcule las frecuencias de los alelos del marcador de DNA. Si esta población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, ¿cuántos heterozigotos se esperaría que hubiera?

Efectos genéticos de la consanguinidad

La consanguinidad da lugar a la producción de individuos homozigotos para alelos recesivos que anteriormente estaban ocultos en los heterozigotos. Debido a que muchos alelos recesivos son deletéreos en homozigosis, una consecuencia de la consanguinidad es un aumento de la probabilidad de que un individuo sea homozigoto para un alelo recesivo deletéreo. Las poblaciones con consanguinidad tendrán normalmente una eficacia biológica disminuida. La **depresión por consanguinidad** es una medida de la pérdida de eficacia biológica ocasionada por consanguinidad. En animales y vegetales domesticados, la consanguinidad y la selección se han utilizado durante miles de años y estos organismos ya han alcanzado un alto grado de homozigosis en muchos loci. Una mayor consanguinidad producirá normalmente solo una pequeña pérdida de eficacia biológica. Sin embargo, la consanguinidad entre individuos de poblaciones grandes con apareamiento al azar, puede dar altos niveles de depresión consanguínea. Este efecto se puede ver examinando las tasas de mortalidad en los descendientes de animales consanguíneos en zoos (Tabla 25.4). El impacto potencial de la consanguinidad en las poblaciones de especies amenazadas y en peligro de extinción se discutirá más extensamente en el Capítulo 27.

En la especie humana, los efectos de la consanguinidad son aumentar el riesgo de abortos espontáneos, muertes de recién nacidos, deformidades congénitas y trastornos genéticos recesivos. Aunque menos frecuente que en el pasado, la consanguinidad se produce en muchas regiones del globo, en donde las costumbres sociales favorecen el matrimonio entre primos hermanos. Alan Bittles y James Neel analizaron datos de numerosos estudios en diferentes culturas. Encuentran que la tasa de mortalidad infantil (es decir, la muerte en los primeros años de vida) varía mucho de una cultura a otra. Independientemente de cual sea la tasa de mortalidad base de niños de padres no emparentados, los hijos de primos hermanos prácticamente

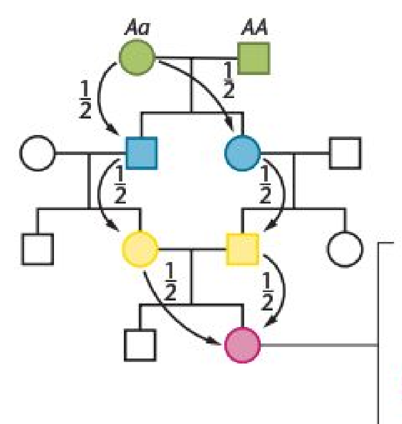


FIGURA 25.18 Cálculo del coeficiente de consanguinidad (F) de los descendientes de un matrimonio entre primos hermanos.

TABLA 25.4 **MORTALIDAD EN LOS DESCENDIENTES DE ANIMALES CONSANGUÍNEOS DE UN ZOO**

Especies	n		No consanguíneos	Consanguíneos	Coeficiente de consanguinidad
Cebra	32	Vivos:	20	3	0,250
		Muertos:	7	2	
Ciervo de Eld	24	Vivos:	13	0	0,250
		Muertos:	4	7	
Jirafa	19	Vivos:	11	2	0,250
		Muertos:	3	3	
Órix	42	Vivos:	35	0	0,250
		Muertos:	2	5	
Gacela Dorcas	92	Vivos:	36	17	0,269
		Muertos:	14	25	

siempre tienen una tasa de mortalidad superior —típicamente unos 4,5 puntos porcentuales por encima.

Sin embargo, es importante advertir que la consanguinidad no es siempre perjudicial. Realmente, la consanguinidad se ha reconocido durante mucho tiempo como una herramienta útil para los mejoradores de animales y vegetales domesticados. Cuando se inicia un programa de mejora, aumenta la consanguinidad, y en algunos grupos quedan fijados alelos favorables y en otros, alelos desfavorables. Seleccionando los vegetales y animales más viables y vigorosos, se puede incrementar la proporción de individuos que llevan caracteres deseables.

Si se cruzan los miembros de dos líneas consanguíneas, los hijos híbridos son a menudo más vigorosos en los caracteres deseables que cualquiera de las líneas paternas. Este fenómeno se denomina vigor híbrido. Cuando se utilizó tal método en los programas de mejora establecidos para el maíz, la producción se incrementó espectacularmente. Sin embargo, en la generación F_1 el vigor híbrido es el más elevado y normalmente declina en las generaciones siguientes, debido a la segregación de alelos adicionales y a la recombinación. Por ello, los híbridos se deben obtener cada vez mediante el cruce de las líneas paternas consanguíneas originales.

El vigor híbrido se ha explicado de dos maneras. La primera hipótesis, la hipótesis de la dominancia, se basa en lo inverso de lo que ocurre en la depresión consanguínea, que inevitablemente debe ocurrir en cruces no consanguíneos. Consideremos un cruce entre dos variedades de maíz con los siguientes genotipos:

$$\begin{array}{ccccc} \text{Variedad A} & & \text{Variedad B} & & F_1 \\ aaBBCCddee & \times & AAbbccDDEE & \longrightarrow & AaBbCcDdEe \end{array}$$

Los híbridos F_1 son heterozigotos para todos los loci que se presentan. Cualquier alelo recesivo deletéreo presente en homozigosis en los padres quedará enmascarado en los híbridos por los alelos dominantes más favorables. Se piensa que tal enmascaramiento es la causa del vigor híbrido.

La segunda teoría, de la superdominancia, mantiene que en muchos casos el heterozigoto es superior a ambos homozigotos. Esto puede estar relacionado con el hecho de que en el heterozigoto pueden estar presentes dos formas de un producto génico, proporcionando una forma de diversidad bioquímica. Así, el efecto acumulativo de la heterozigosis de muchos loci explicaría el vigor híbrido. Muy probablemente, tal vigor es el resultado de la combinación de los fenómenos explicados por las dos hipótesis.

Hemos visto que el apareamiento no aleatorio puede dar lugar a que las frecuencias genotípicas de una población se alejen de los valores esperados de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg. Esto puede afectar directamente al curso de la evolución. Como en variedades hechas adrede consanguíneas por mejoradores de vegetales y animales, la consanguinidad en poblaciones naturales puede aumentar la frecuencia de los genotipos homozigotos para alelos recesivos deletéreos. En variedades domésticas, esto aumenta la eficacia de la selección en eliminar los alelos deletéreos de la población. Por ello, una vez que los alelos deletéreos se han eliminado, la consanguinidad no causa más problemas.



GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Rastreando las huellas genéticas fuera de África

¿De donde venimos? ¿Somos una familia humana con pequeñas diferencias o estamos separados en razas con antiguas y profundas raíces? Durante milenios, nuestros esfuerzos por contestar estas preguntas invocaban leyendas, mitologías e historias de la creación de nuestras muchas religiones. Durante los últimos siglos, los paleontólogos han aplicado una variedad de herramientas científicas sofisticadas para explorar nuestros orígenes y parentesco humano. La historia desarrollada de nuestros comienzos, basada en la genética actual, es tan fascinante como controvertida como cualquier mito creacionista.

Basado en los caracteres físicos y en la distribución de los homínidos fósiles, muchos paleo-antropólogos están de acuerdo con que el homínido *Homo erectus*, con gran

cerebro y utilizando herramientas, apareció en África oriental hace unos 2 millones de años. Esta especie utilizó herramientas de piedra sencillas, cazó, pero no pescó, no construyó casas ni utilizó el fuego y no practicó enterramientos rituales. Hace unos 1,7 millones de años el *H. erectus* se extendió por Eurasia y sur de Asia. Muchos científicos también están de acuerdo en que el *H. erectus* probablemente dio lugar a varios tipos de homínidos, como los Neandertales (en Europa) y el hombre de Pekín y el hombre de Java (en Asia). Estos homínidos eran robustos anatómicamente, con esqueletos y cráneos grandes y pesados. Los Neandertales y otros grupos de *H. erectus* desaparecieron hace unos 50.000 a 30.000 años —aproximadamente al mismo tiempo que aparecieron en todo el mundo humanos anatómicamente modernos (*H. sapiens*).

Es en este momento de nuestra historia —cuando los homínidos antiguos dieron lugar a los humanos, con esqueletos más ligeros y anatómicamente modernos— que surge la controversia.

En la actualidad, hay dos hipótesis dominantes que explican nuestros orígenes. Las hipótesis del reemplazamiento africano y la multirregional La hipótesis multirregional se basa principalmente en datos arqueológicos y de fósiles. Propone que el *H. sapiens* se desarrolló gradual y simultáneamente por todo el mundo a partir de grupos de *H. erectus*, incluidos los Neandertales. El cruce entre estos grupos dio lugar finalmente a la especie *H. sapiens* genéticamente homogénea. Luego, la selección natural durante 1,5 millones de años dio lugar a variantes regionales (razas) tal como las vemos actualmente. En el punto de vista multirregional, nuestra constitución genética incluiría contribuciones de los Neandertales y de otros grupos de *H. erectus*. En contraste, la hipótesis del reemplazamiento africano, que se basa principalmente en el análisis genético de las poblaciones humanas actuales, sostiene que el *H. sapiens* evolucionó de descendientes del *H. erectus* en el África sub-sahariana, hace unos 200.000 a 400.000 años. Un pequeño grupo de *H. sapiens* (menos de 10.000) abandonó entonces África, expandiéndose y migrando hacia Europa y Asia hace unos 100.000 años. Hace unos 60.000 años las poblaciones de *H. sapiens* alcanzaron Australia y más tarde migraron hacia Norteamérica. En la hipótesis del reemplazamiento africano, el *H. sapiens* sustituyó a los tipos de *H. erectus* preexistentes, sin cruzarse con ellos. De este modo, el *H. sapiens* se convirtió en la única especie del género, hace unos 30.000 años.

Aunque todavía en litigio, muchos datos genéticos parece que apoyan la hipótesis del reemplazamiento africano. Los humanos de todo el globo son genéticamente muy similares. Las secuencias de DNA de cualquier pueblo elegido al azar son idénticas en un 99,9%. Hay más identidad genética entre dos personas elegidas al azar de una población humana que entre dos chimpancés elegidos al azar de una población de chimpancés. Es interesante que cerca del 90% de las diferencias genéticas que existen se produzcan entre individuos, en lugar de entre poblaciones. En este inusitado alto grado de parentesco genético de todos los humanos alrededor del planeta se apoya la idea de que nuestra especie surgió recientemente de un pequeño grupo de humanos fundadores.

Los estudios de las secuencias de DNA mitocondrial de poblaciones humanas actuales revela que el mayor grado de variación genética se da en poblaciones africanas. Los africanos presentan una diversidad en el DNA mitocondrial dos veces mayor que la de los no africanos. Esto implica que las ramas primitivas del *H. sapiens* divergieron en África y tuvieron más tiempo para acumular mutaciones en el DNA mitocondrial, que se cree se acumulan a un ritmo constante con el tiempo.

Las secuencias del DNA mitocondrial, del cromosoma Y y de los marcadores del cromosoma 21 apoyan la idea de que nuestras raíces se encuentran en África oriental y de que la migración desde África ocurrió a través de Etiopía, a lo largo de la costa de la península Arábiga y hacia Eurasia y el sudeste Asiático. Datos recientes basados en la diversidad de la secuencia del DNA de microsatélites nucleares apoyan la idea de que los humanos migraron desde África y se dispersaron por todo el mundo a partir de una pequeña población fundadora. Las problaciones del África sub-sahariana presentan el mayor nivel de heterozigosis en los microsatélites que los de Oriente medio, Europa, Asia oriental, Oceanía y las Américas —en este orden. Las poblaciones nativas americanas presentan alrededor de un 15% menos de heterozigosis en los microsatélites que la que se observa en los africanos.

Comparando las diferencias en las secuencias del DNA entre poblaciones de todo el mundo y extrapolando hacia atrás a un tiempo en el que todas las secuencias deberían haber sido las mismas, los paleoantropólogos proponen que el *H. sapiens* moderno se desarrolló a partir de un pequeño grupo africano hace entre 200.000 y 400.000 años. El momento en el que se dio la migración desde África se calcula hace entre 50.000 y 100.000 años.

La reciente secuenciación del DNA mitocondrial de Neandertales demuestra que es tan diferente del nuestro que los Neandertales fueron probablemente una especie distinta y que los Neandertales y el *H. sapiens* divergieron hace unos 600.000 años. Por ello, parece improbable que los Neandertales y quizás otros grupos de *H. erectus*, como el hombre de Pekín, contribuyeran significativamente al conjunto de genes del *H. sapiens*.

Así, si todos los pueblos de la Tierra son tan similares genéticamente, ¿cómo llegamos a tener tal rango de diferencias físicas, que algunos describen como diferencias raciales? Muchos genéticos creen que los cambios genéticos responsables de estas características, como el color de la piel y los rasgos faciales, pudieron acumularse durante cortos periodos de tiempo, especialmente si estas características son adaptativas para condiciones climáticas y geográficas concretas.

Como cualquier explicación de los orígenes humanos, la hipótesis del reemplazamiento africano se debate activamente y puede sufrir mutación —o incluso extinción— con el tiempo. Cuando se mejoren los métodos para secuenciar DNA de fósiles antiguos, es posible que se llenen los huecos del camino genético que nos condujo fuera de África y nos ayude a resolver estas viejas cuestiones sobre nuestros orígenes.

Referencias

Cavalli-Sforza, L.L., and Feldman M.W., 2003. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat. Gen. (Suppl.)* 33: 266-75.

Páginas Web

Johanson, D. 2001. *Origins of modern humans: Multiregional or out of Africa?* [on-line.]

http://www.actionbioscience.org/evolution/johanson.html

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Las poblaciones evolucionan como consecuencia de los cambios en las frecuencias alélicas en cierto número de loci durante un tiempo. La genética de poblaciones estudia los factores que dan lugar al cambio de las frecuencias alélicas y la distribución de la variación genética en las poblaciones.
2. La ley de Hardy-Weinberg proporciona un modelo matemático simple para describir las relaciones entre las frecuencias alélicas y las genotípicas de una población. Esto permite predecir las frecuencias alélicas o genotípicas de un locus dado en una población que cumpla una serie de condiciones. Si no hay selección, mutación o migración, si la población es grande, y si los individuos se cruzan al azar, entonces las frecuencias alélicas o genotípicas no cambiarán de una generación a la siguiente.
3. La fórmula de Hardy-Weinberg es también útil para investigar si la población está o no en equilibrio evolutivo en un locus dado y para estimar la frecuencia de los heterozigotos en la población a partir de la frecuencia de los homozigotos recesivos.
4. Especificando las condiciones bajo las cuales las frecuencias alélicas no cambian, la ley de Hardy-Weinberg identifica las fuerzas que pueden conducir la evolución de la población. Selección, mutación, migración y deriva genética pueden dar lugar al cambio de las frecuencias alélicas.
5. El apareamiento no aleatorio modifica las frecuencias genotípicas, pero no las frecuencias alélicas de la población. La consanguinidad, o cruce entre parientes, es la forma de apareamiento no aleatorio con el mayor impacto: Aumenta la frecuencia de los homozigotos en la población y disminuye la frecuencia de los heterozigotos.
6. La selección natural es la fuerza más poderosa que afecta a las frecuencias alélicas. La tasa de cambio provocada por selección natural depende de las frecuencias alélicas iniciales, la intensidad de la selección y la eficacia relativa de los diferentes genotipos.
7. La mutación y la migración introducen nuevos alelos en la población, pero normalmente tienen poco efecto sobre las frecuencias alélicas. La persistencia de nuevos alelos en la población depende de la eficacia que confieran y de la acción de la selección.
8. La deriva genética produce cambios aleatorios de las frecuencias alélicas como resultado del muestreo de gametos. Puede tener un mayor impacto en poblaciones pequeñas.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Mutaciones de pérdida de función en un gen del cromosoma 15 que codifica una enzima lisosómica dan lugar a la enfermedad de Tay-Sachs. Se hereda como recesiva autosómica. Entre los judíos Ashkenazi, con ascendencia de Europa central, alrededor de 1 cada 3.600 niños nacen con la enfermedad. ¿Qué proporción de individuos de esta población son portadores?

Solución: Si p representa la frecuencia del alelo silvestre y q la frecuencia de los alelos recesivos con pérdida de función, y si asumimos que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, entonces la frecuencia de los genotipos viene dada por p^2 para los homozigotos normales, $2pq$ para los heterozigotos y q^2 para los homozigotos con Tay-Sachs. Así, la frecuencia de los alelos Tay-Sachs será

$$q = \sqrt{q^2} = \sqrt{\frac{1}{3.600}} = 0{,}017$$

Ya que $p + q = 1$, tendremos

$$p = 1 - q = 1 - 0{,}017 = 0{,}983$$

Por consiguiente, podemos estimar que la frecuencia de los portadores es

$$2pq = 2(0{,}983)(0{,}017) = 0{,}033 \text{ o } 1 \text{ en } 30.$$

2. La *eugenesia* es el término empleado para la mejora selectiva en la especie humana para conseguir mejoras en las poblaciones. Como medida eugenésica, se ha sugerido (a veces por mandato legal) que a los individuos que sufren graves anomalías genéticas se les debería impedir que se reprodujeran (sí fuera necesario, esterilizándolos) a fin de reducir su frecuencia en generaciones futuras. Suponga que tal tipo de carácter recesivo estuviera presente en la población en una frecuencia de 1 en 40.000, y que los individuos afectados no se reprodujeran. Después de 10 generaciones, o unos 250 años, ¿cuál sería la frecuencia de dicha anomalía? ¿Son efectivas las medidas eugenésicas en este caso?

Solución: Sea q la frecuencia del alelo recesivo responsable del trastorno. Ya que el trastorno es recesivo, podemos estimar que

$$q = \sqrt{\frac{1}{40.000}} = 0{,}005$$

Si se evita que se reproduzcan todos los individuos afectados, entonces, en sentido evolutivo, el trastorno es letal: Los individuos afectados tiene una eficacia cero. Esto significa que podemos predecir la frecuencia del alelo recesivo después de 10 generaciones utilizando la siguiente ecuación:

$$q_g = q_0/(1 + gq_0)$$

En este caso, $q_0 = 0{,}005$ y $g = 10$, por lo que tendremos

$$q_{10} = \frac{(0{,}005)}{[1 + (10 \times 0{,}005)]}$$

$$= 0{,}0048$$

Si $q_{10} = 0{,}0048$, entonces la frecuencia de los individuos homozigotos recesivos será aproximadamente

$$(q_{10})^2 = (0{,}0048)^2 = 0{,}000023 = \frac{1}{43.500}$$

La frecuencia de la anomalía se ha reducido de 1 en 40.000 a 1 en 43.500 en 10 generaciones, indicando que esta medida eugenésica tiene una efectividad limitada.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. La capacidad para gustar el compuesto PTC está controlado por un alelo dominante *T*, mientras que los individuos homozigotos para el alelo recesivo *t* son incapaces de gustar este compuesto. En una clase de genética de 125 estudiantes, 88 pudieron gustar la PTC y 37 no. Calcule la frecuencia de los alelos *T* y *t* en esta población y la frecuencia de los genotipos.

2. Calcule la frecuencia de los genotipos *AA*, *Aa* y *aa* después de una generación si la población original estaba formada por las frecuencias genotípicas 0,2 *AA*, 0,6 *Aa* y 0,2 *aa* y se cumplen las condiciones de Hardy-Weinberg. ¿Qué frecuencias genotípicas habrá después de una segunda generación?

3. Considere una rara anomalía en una población ocasionada por una mutación autosómica recesiva. A partir de las siguientes frecuencias de la anomalía en la población, calcule el porcentaje de portadores heterozigotos:
(a) 0,0064 (b) 0,000081 (c) 0,09
(d) 0,01 (e) 0,10

4. ¿Qué se debe asumir a fin de validar las respuestas del Problema 3?

5. En una población en donde se conoce el número total de individuos con el fenotipo dominante, ¿cómo se puede calcular el porcentaje de portadores y de homozigotos recesivos?

6. De los siguientes dos grupos de datos, determine si representan a poblaciones que están en equilibrio de Hardy-Weinberg (si es necesario, utilice el análisis de χ^2).
(a) Genotipos *CCR5*: *1/1*, 60 por ciento, *1/Δ32*, 35,1 por ciento y *Δ32/Δ32* 4,9 por ciento.
(b) Hemoglobina falciforme: *AA*, 75,6 por ciento; *AS*, 24,2 por ciento; *SS*, 0,2 por ciento.

7. Si el 4 por ciento de una población en equilibrio manifiesta el carácter recesivo, ¿cuál es la probabilidad de que los descendientes de dos individuos que no expresan el carácter lo manifiesten?

8. Considere una población en la que la frecuencia del alelo *A* es $p = 0{,}7$ y la frecuencia de alelo *a* es $q = 0{,}3$, siendo los alelos codominantes. ¿Cuáles serán las frecuencias alélicas después de una generación sí ocurre lo siguiente?
(a) $w_{AA} = 1$, $w_{Aa} = 0{,}9$ y $w_{aa} = 0{,}8$
(b) $w_{AA} = 1$, $w_{Aa} = 0{,}95$ y $w_{aa} = 0{,}9$
(c) $w_{AA} = 1$, $w_{Aa} = 0{,}99$ y $w_{aa} = 0{,}98$
(d) $w_{AA} = 0{,}8$, $w_{Aa} = 1$ y $w_{aa} = 0{,}8$

9. Si las frecuencias iniciales son $p = 0{,}5$ y $q = 0{,}5$, y el alelo *a* es letal recesivo, ¿cuáles serán las frecuencias después de 1, 5, 10, 25, 100 y 1.000 generaciones?

10. ¿Bajo que circunstancias podría persistir un alelo letal dominante en una población?

11. Determine la frecuencia del alelo *A* en una población isleña después de una generación de migración desde el continente en las siguientes condiciones:
(a) $p_i = 0{,}6$; $p_m = 0{,}1$; $m = 0{,}2$
(b) $p_i = 0{,}2$; $p_m = 0{,}7$; $m = 0{,}3$
(c) $p_i = 0{,}1$; $p_m = 0{,}2$; $m = 0{,}1$

12. Suponga que en una población se da un trastorno autosómico recesivo en un individuo cada 10.000 (0,0001), y que en esta población cerca del 2 por ciento (0,02) de los individuos son portadores del trastorno. Estime la probabilidad de que un descendiente de un matrimonio entre primos hermanos presente este trastorno. Compare esta probabilidad con la de la población en conjunto.

13. ¿Cuál es la base de la depresión consanguínea?

14. Describa cómo se puede utilizar la consanguinidad en la domesticación de plantas y animales. Discuta las teorías subyacentes a estas técnicas.

15. Evalúe la siguiente frase: La consanguinidad aumenta la frecuencia de los alelos recesivos en una población.

16. En un programa de mejora vegetal para mejorar plantas cultivadas, ¿cuál de los siguientes sistemas de cruzamientos debería emplearse para dar lugar a líneas homozigóticas en el menor tiempo posible?
(a) autofecundación
(b) cruzamientos hermano por hermana
(c) cruzamientos entre primos hermanos
(d) cruzamientos al azar
Ilustre su elección con esquemas de las genealogías.

17. Si el fenotipo albino está presente en 1/10.000 de los individuos de una población en equilibrio, y el albinismo está ocasionado por un alelo autosómico recesivo *a*, calcule la frecuencia de
(a) el alelo mutante recesivo
(b) el alelo normal dominante
(c) los heterozigotos de la población
(d) los cruzamientos entre heterozigotos

18. En una población humana de 4.000 individuos hay dos varones diagnosticados con hemofilia. Suponiendo que en esta población el 50 por ciento son varones y el 50 por ciento son mujeres, ¿cuántas mujeres serán portadoras de la hemofilia?

19. Uno de los primeros caracteres mendelianos identificados en la especie humana fue la anomalía dominante conocida por *braquidactilia*. Este gen da lugar a un acortamiento anormal de los dedos de la mano o del pie (o ambos). En aquel tiempo algunos creyeron que este carácter dominante debería extenderse hasta que el 75 por ciento de la población quedara afectada (ya que la proporción fenotípica de dominante a recesivo es 3:1). Demuestre que este razonamiento no es correcto.

20. La acondroplasia es un carácter dominante que da lugar a una forma característica de enanismo. En un estudio de 50.000 nacimientos, se identificaron 5 niños con acondroplasia. Tres de los niños afectados tenían padres afectados, mientras que los otros dos tenían padres normales. Calcule la tasa de mutación para la acondroplasia y exprese dicha tasa como el número de genes mutantes por número de gametos dado.

21. Un novio previsor, que es normal, tiene una hermana con fibrosis quística (CF), una enfermedad autosómica recesiva. Sus dos padres son normales. Decide casarse con una mujer que no tiene antecedentes de CF en su familia. ¿Cuál es la probabilidad de que él tenga un niño con CF? Ambos son blancos y la frecuencia de la CF en la población blanca es de 1/2.500 —es decir, un niño afectado cada 2.500. (Suponga que la población cumple las condiciones de Hardy-Weinberg.)

22. Un botánico, al estudiar lirios de agua en una balsa aislada, observa tres formas de hoja en la población: redonda, en punta de flecha y festoneada. El análisis con marcadores de DNA de 125

individuos demostró que las plantas con hojas redondas eran homozigotas para el alelo *r1*, mientras que las plantas con hojas en punta de flecha eran homozigotas para un alelo distinto del mismo locus, el *r2*. Las plantas con las hojas festoneadas presentaron perfiles de DNA con ambos marcadores *r1* y *r2*. La frecuencia del marcador *r1* se estimó en 0,81.

Si el botánico contó 20 plantas con hojas festoneadas en la balsa, ¿cuál es el coeficiente de consanguinidad *F* en esta población?

23. Un agricultor plantó maíz transgénico Bt, que esta modificado genéticamente para producir su propio insecticida. De las larvas del taladro del maíz que se alimentaron de estas plantas de maíz Bt, solo sobrevivió el 10 por ciento, a no ser que tuvieran al menos una copia del alelo dominante resistente B, que confiere resistencia al insecticida de Bt. Cuando el agricultor sembró por primera vez plantas de maíz Bt, la frecuencia del alelo resistente B en el taladro del maíz era de 0,02. ¿Cuál será la frecuencia del alelo para la resistencia después de una generación de que el taladro del maíz se alimente del maíz Bt?

24. En una población aislada de 50 carneros de cuernos grandes del desierto, se ha encontrado un alelo recesivo mutante *c* que da lugar a lana rizada, tanto en machos como en hembras. El alelo dominante normal *C* da lugar a lana lisa. Un biólogo que estudiaba estos carneros encontró cuatro con lana rizada y tomó muestras de sangre para analizar marcadores de DNA, que reveló que 17 de los carneros con lana lisa eran portadores del alelo *c*. ¿Cuál es el coeficiente de consanguinidad *F* de esta población?

25. Para incrementar la diversidad genética de la población de carneros del Problema 24, se introdujeron 10 carneros de una población de una región distinta, en donde no había el alelo *c*. Suponiendo apareamiento al azar entre los carneros originales y los introducidos, y que el alelo *c* es selectivamente neutro, ¿cuál será la frecuencia de *c* en la generación siguiente?



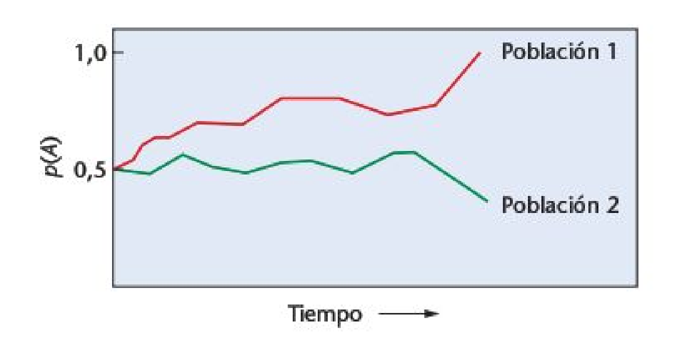
Problemas extra-picantes

26. Hacia finales de la década de 1930, Richard Ellis y Simon van Creveld descubrieron una forma de enanismo, conocida como síndrome de Ellis-van Creveld. Cuando compartían el compartimento de un tren que les llevaba a una reunión de pediatras constataron que ambos tenían un paciente con este síndrome. Publicaron la descripción del síndrome en 1940. Los individuos afectados tienen una forma de enanismo con miembros cortos, a menudo con otros defectos en labios y dientes y con polidactilia (dedos extra). La genealogía más grande de esta anomalía la publicó Victor McKusick y colaboradores (1964) en una población de la Vieja Orden de los Amish de la región occidental de Pensilvania. En dicha comunidad, cerca del 5 por 1.000 de los nacidos estaban afectados y en una población de 8.000 la frecuencia observada fue del 2 por 1.000. Todos los individuos afectados tenían padres no afectados y todos los casos afectados se podían rastrear hasta un antecesor común, Samuel King y su esposa, que llegaron a la zona en 1774. Se sabe que ni King ni su esposa estaban afectados por esta anomalía. No se detectaron casos de esta anomalía en otras comunidades Amish, como las de Ohio e Indiana.

(a) A partir de esta información, deduzca el modo de herencia más probable de esta anomalía. Utilizando la ley de Hardy-Weinberg, calcule la frecuencia del alelo mutante en la población y la frecuencia de los heterozigotos, suponiendo las condiciones de Hardy-Weinberg.

(b) ¿Cuál es la explicación más probable de la alta incidencia de esta anomalía en la comunidad Amish de Pensilvania, y de su ausencia en otras comunidades Amish?

27. El siguiente gráfico muestra la variación de la frecuencia de un alelo dado, (*A*) que se produjo durante un tiempo, en dos poblaciones relativamente pequeñas e independientes expuestas a situaciones ambientales muy similares. Un estudiante analizó el gráfico y concluyó que la mejor explicación de estos datos es que en la población 1 se está dando selección para el alelo *A*. ¿Es correcta la conclusión del estudiante? Explíquelo.



LECTURAS SELECCIONADAS

Ansari-Lari, M.A., et al. 1997. The extent of genetic variation in the *CCR5* gene. *Nature Genetics* 16:221-22.

Ballou, J., and Ralls, K. 1982. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates: A detailed analysis. *Biol. Conserv.* 24:239-72.

Barton, N.H., and Turelli, M. 1989. Evolutionary quantitative genetics: How little do we know? *Annu. Rev. Genet.* 23:337-70.

Bittles, A.H., and Neel, J.V. 1994. The costs of human inbreeding and their implications for variations at the DNA level. *Nature Genet.* 8:117-21.

Carrington, M., and Kissner, T., et al. 1997. Novel alleles of the chemokine-receptor gene *CCR5*. *Am. J. Hum. Genet*. 61:1261-67.

Chevillon, C., et al. 1995. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 49: 997-1007.

Crow, J.F. 1986. *Basic concepts in population, quantitative and evolutionary genetics*. New York: W. H. Freeman.

Dudley, J.W. 1977. 76 generations of selection for oil and protein percentage in maize. In *Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics*, ed. E. Pollack, et al., pp. 459-73. Ames, IA: Iowa State University Press.

Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford, U.K.: Clarendon Press. (Reprinted Dover Press, 1958)

Freeman, S., and Herron, J.C. 2001. *Evolutionary analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Freire-Maia, N. 1990. Five landmarks in inbreeding studies. *Am. J. Med. Genet*. 35:118-20.

Gayle, J.S. 1990. *Theoretical population genetics*. Boston, MA: Unwin-Hyman.

Grant, P.R. 1986. *Ecology and evolution of Darwin's finches*. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Hartl, D.L. and Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3d ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Jones, J.S. 1981. How different are human races? *Nature* 293:188-90.

Karn, M.N., and Penrose, L.S. 1951. Birth weight and gestation time in relation to maternal age, parity and infant survival. *Ann. Eugen*. 16:147-64.

Kerr, W.E., and Wright, S. 1954. Experimental studies of the distribution of gene frequencies in very small populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 8:172-77.

Khoury, M.J., and Flanders, W.D. 1989. On the measurement of susceptibility to genetic factors. *Genet. Epidemiol*. 6:699-701.

Laikre, L., Ryman, N., and Thompson, E.A. 1993. Hereditary blindness in a captive wolf (*Canis lupus*) population: Frequency reduction of a deleterious allele in relation to gene conservation. *Conservation Biol*. 7:592-601.

Leibert, F., et al. 1998. The *DCCR5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in northeastern Europe. *Hum. Molec. Genet*. 7:399-406.

Liu, R., et al. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance in some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-77.

Lucotte, G., and Mercier, G. 1998. Distribution of the *CCR5* gene 32-bp deletion in Europe. *J. Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 19:174-77.

Markow, T., et al. 1993. HLA polymorphism in the Havasupai: Evidence for balancing selection. *Am. J. Hum. Genet*. 53:943-52.

Martinson, J.J., et al. 1997. Global distribution of the *CCR5* gene 32-bp deletion. *Nature Genet*. 16:100-103.

Mettler, L.E., Gregg, T., and Schaffer, H.E. 1988. *Population genetics and evolution*. 2d ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Parra, E.J., et al. 1998. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am. J. Hum. Genet*. 63:1839-51.

Pier, G.B., et al. 1998. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82.

Quillent, C., et al. 1998. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of *CCR5* gene. *The Lancet* 351:14-18.

Renfrew, C. 1994. World linguistic diversity. *Sci. Am*. (Jan.) 270:116-23.

Roberts, D.F. 1988. Migration and genetic change. *Hum. Biol*. 60:521-39.

Samson, M., et al. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the *CCR-5* chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-25.

Spiess, E.B. 1989. *Genes in populations*. 2d ed. New York: Wiley.

Stephens, J.C., et al. 1998. Dating the origin of the *CCR5-Δ32* AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am. J. Hum. Genet*. 62:1507-15.

Wallace, B. 1989. One selectionist's perspective. *Quart. Rev. Biol*. 64:127-45.

Woodworth, C.M., Leng, E.R., and Jugenheimer, R.W. 1952. Fifty generations of selection for protein and oil in corn. *Agron. J*. 44:60-66.

Yudin, N.S., et al. 1998. Distribution of *CCR5-Δ32* gene deletion across the Russian part of Eurasia. *Hum. Genet*. 102:695-98.

Genética evolutiva



Formas clara y oscura de la polilla Biston betularia sobre la corteza clara de un árbol. Estas polillas se han citado a menudo como ejemplo de cambios evolutivos rápidos, resultantes de presiones selectivas durante la revolución industrial en Gran Bretaña.

Conceptos del capítulo

- La evolución se puede producir por transformación o por desdoblamiento de conjuntos de genes.
- Muchas poblaciones y especies albergan considerable variación genética.
- La estructura genética de las poblaciones cambia a lo largo del espacio y del tiempo.
- La definición de especie es un gran reto para los biólogos evolutivos.
- Una reducción en el flujo génico entre poblaciones, acompañado por selección divergente o deriva genética, puede dar lugar a la especiación.
- Para reconstruir la historia evolutiva se utilizan las diferencias genéticas entre poblaciones o entre especies.



Antes de embarcarnos en una discusión sobre genética y evolución, consideremos los siguientes escenarios:

(1) Hacia finales de 1986 se comprobó que un dentista de Florida daba positivo para el VIH. Varios meses más tarde fue diagnosticado con SIDA. Continuó con la práctica de dentista durante dos años mas, hasta que uno de sus pacientes, una mujer sin factores de riesgo conocidos, se descubrió que también estaba infectada por el VIH. Cuando el dentista urgió públicamente a sus otros pacientes que se analizaran, se encontró que varios de ellos eran positivos para el VIH. ¿Transmitió el dentista el VIH a sus pacientes, o los pacientes quedaron infectados de alguna otra manera?

(2) Las evidencias fósiles indican que los neandertales (*Homo neanderthalensis*) vivieron en Europa y en Oriente próximo hace de 300.000 a 30.000 años. Durante algún tiempo, los neandertales coexistieron con humanos anatómicamente modernos (*Homo sapiens*). Debido a que vivieron en los mismos lugares y al mismo tiempo, ¿se cruzaron los neandertales y los humanos modernos, de tal manera que en la actualidad viven descendientes de los neandertales, o los neandertales murieron, por lo que su linaje se ha extinguido?

(3) Las mitocondrias de nuestras células tienen su propio DNA. La organización y función del genoma mitocondrial presenta muchas semejanzas con la organización y función del genoma bacteriano. ¿Se originaron nuestras mitocondrias como bacterias de vida libre que se introdujeron en el interior de otras células, o el genoma de las mitocondrias deriva finalmente de los cromosomas nucleares?

Estos escenarios plantean tres cuestiones aparentemente no relacionadas. Sin embargo, estas cuestiones tienen de hecho algo en común: Todas ellas se pueden contestar utilizando datos genéticos para reconstruir su evolución. La adquisición y análisis de tales datos es el objetivo de este capítulo. Utilizaremos los métodos de análisis genético y la reconstrucción de la historia evolutiva para responder a las cuestiones anteriores al final del capítulo.

La evolución es la consecuencia de dos procesos: la transformación y la desdoblamiento de linajes. Juntos pueden producir una diversidad de poblaciones y especies. En el Capítulo 25 describimos la evolución de las poblaciones en términos de cambios de las frecuencias alélicas y subrayamos las fuerzas que pueden dar lugar a tales cambios de frecuencias. En este capítulo veremos cómo los procesos genéticos microevolutivos en poblaciones pueden ampliarse a procesos macroevolutivos. La mutación, migración, selección y deriva, individual y colectivamente, alteran las frecuencias alélicas y ocasionan divergencias evolutivas que finalmente pueden dar lugar a la formación de especies. El proceso de especiación es ayudado por la diversidad ambiental o ecológica. Si una población se extiende en un área geográfica que abarca cierto número de ambientes ecológicamente diferentes, con diferentes presiones selectivas, las poblaciones que ocupan estas áreas pueden adaptarse gradualmente y llegar a diferenciarse genéticamente. Las poblaciones diferenciadas son dinámicas. Pueden seguir existiendo, extinguirse, reunirse con otras o continuar divergiendo hasta formar especies nuevas.

Debido a que las poblaciones y especies aisladas acumulan diversidad genética, podemos utilizar patrones de diferencias genéticas en varios grupos para reconstruir su historia evolutiva. Después de explorar la estructura genética de las poblaciones, sus divergencias a lo largo del espacio y del tiempo y del proceso de especiación, discutiremos cómo se pueden utilizar los datos genéticos para responder a cuestiones que tienen un contexto evolutivo, como las de los tres escenarios al comienzo del capítulo.

26.1 La especiación puede ocurrir por transformación o por desdoblamiento de conjuntos de genes

En la Figura 26.1 se muestra un árbol evolutivo, o **filogenia**, que describe la historia de varias especies hipotéticas de lagartijas. El paso del tiempo se sitúa en el eje horizontal a medida que se dan cambios en el fenotipo de las lagartijas y los linajes divergen o se separan.

La historia de estas lagartijas comienza con la especie 1. Durante algún tiempo dicha especie experimenta una **estasis** evolutiva; es decir, no cambia. Luego la especie 1 sufre un proceso de transformación sostenida, llamada **evolución filética** o **anagénesis** y se convierte en la especie 2. Durante este proceso solo hay una especie presente en todo momento, y la identificación del momento concreto en el que la especie 1 se convierte en la 2 es difícil. Después de la formación de la especie 2, sufre **cladogénesis**, dando lugar a dos especies hijas distintas e independientes. Las transformaciones posteriores de estas especies hijas darán lugar a las especies que vemos hoy, especies 3 y 4.

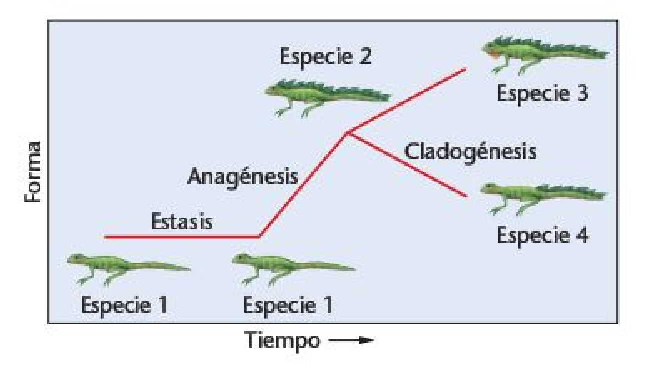


FIGURA 26.1 En la evolución filética, o anagénesis, una especie se transforma en otra con el tiempo. En cualquier momento, sólo existe una especie. En la cladogénesis, una especie se divide en dos o más especies.

Estas especies existentes son en muchos casos verificables experimentalmente. Es decir, se pueden comprobar para determinar su compatibilidad reproductiva (una especie) o su incompatibilidad (dos especies).

Charles Darwin, en su libro *On the Origin of Species* (1859) acumuló evidencias de que todas las especies derivan de un antecesor común mediante transformación y especiación:

> Todos los seres vivos tienen mucho en común, en su composición química, sus vesículas germinales, su estructura celular y sus leyes de crecimiento y reproducción.... Por consiguiente concluiría ... que probablemente todos los seres orgánicos que han vivido sobre el planeta descienden de alguna forma primordial.

Todo biólogo desde entonces ha aprendido a apoyar las conclusiones de Darwin de que solo existe un árbol de la vida. Para comprender la evolución, debemos comprender el mecanismo que transforma una especie en otra y que escinde a una especie en dos o más.

El Capítulo 25 presentó los mecanismos responsables de la transformación de especies. El principal es la selección natural, descubierta independientemente por Darwin y Alfred Russel Wallace. El concepto de selección natural de Darwin-Wallace se puede resumir como sigue:

1. Los individuos de una especie presentan variaciones en su fenotipo —por ejemplo, mostrando diferencias en tamaño, agilidad, coloración, defensa contra enemigos, habilidad para obtener alimento, comportamiento en el apareamiento, momento de la floración, etc.
2. Muchas de estas variaciones, incluso las más pequeñas y aparentemente insignificantes, son heredables y pasan a los descendientes.
3. Los organismos tienden a reproducirse de forma exponencial. Se producen muchos más descendientes de los que pueden sobrevivir. Esto da lugar a que los miembros de una especie entablen una lucha por la supervivencia, compitiendo con otros miembros de la comunidad por los recursos escasos. Los descendientes también tienen que evitar a los predadores y, en especies con reproducción sexual, los adultos tienen que competir por la pareja.
4. En la lucha por la supervivencia, los individuos con fenotipos particulares tendrán más éxito que los individuos con otros fenotipos, permitiendo a los primeros sobrevivir y reproducirse a tasas mayores.

Como consecuencia de la selección natural, las especies cambian. Los fenotipos que confieren una mejor capacidad para sobrevivir y reproducirse llegan a ser más frecuentes y los fenotipos que confieren pobres perspectivas para la supervivencia y la reproducción pueden desaparecer finalmente. En ciertas condiciones, las poblaciones que en un momento dado podían cruzarse, pueden perder dicha capacidad, segregándose así sus adaptaciones en nichos concretos. Si esta selección adaptativa se impone en los híbridos producidos por padres de poblaciones distintas, la selección favorece la formación de dos especies en donde había sólo una.

Aunque Wallace y Darwin propusieron que la selección natural explica cómo se produce la evolución, no pudieron explicar ni el origen de la variación que proporciona la materia prima para la evolución ni cómo tal variación pasa de padres a hijos. En el siglo XX, cuando los biólogos aplicaron los principios mendelianos a las poblaciones, ya se había explicado tanto el origen de la variación (mutación) como el mecanismo de la herencia (segregación de alelos). Ahora vemos la evolución como debida a cambios en las frecuencias alélicas en las poblaciones con el tiempo. La unión de la genética de poblaciones con la teoría de la selección natural ha dado lugar a una nueva visión del proceso evolutivo, llamado *neodarwinismo*.

En este capítulo consideraremos los mecanismos responsables de la especiación. Como con la selección natural, nuestra comprensión de la especiación se fundamenta en ideas clave sobre la variación genética.

26.2 La mayoría de las poblaciones y especies albergan considerable variación genética

A primera vista, parece que los miembros de poblaciones bien adaptadas deberían ser muy homozigotos debido a la fijación de los alelos más favorables en cada locus. Ciertamente, el examen de muchas poblaciones de animales y vegetales revela muchas semejanzas fenotípicas entre los individuos. Sin embargo, un gran número de evidencias indica que la mayoría de las poblaciones tienen un alto grado de heterozigosis. Esta diversidad genética está oculta, por decirlo así, porque no es necesariamente aparente en el fenotipo; por ello, detectarla no es una tarea simple. No obstante, con el uso de las técnicas discutidas a continuación, tal investigación ha tenido éxito.

Selección artificial

Una manera de determinar si hay variación genética que afecta a un carácter fenotípico es practicar selección artificial sobre el carácter. Un fenotipo sin variación genética no responderá a la selección; si hay variación genética, el fenotipo cambiará después de una pocas generaciones. Un ejemplo notable de esto es el perro. La amplia serie de tamaños, formas, colores y comportamientos que se observan en razas distintas de perros han surgido todas por selección sobre la variación genética presente en los lobos silvestres, a partir de los cuales descienden los perros. En una escala de tiempo corta, los experimentos de selección en el laboratorio de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha dado lugar a cambios significativos en una pocas generaciones en casi todos los fenotipos imaginables, como el tamaño, la forma, la tasa de desarrollo, la fecundidad y el comportamiento.

Polimorfismos proteicos

La **electroforesis en gel** separa moléculas proteicas en función de las diferencias en tamaño y en carga eléctrica. Si una variación en los nucleótidos de un gen estructural da lugar a la sustitución de un aminoácido cargado, como el ácido glutámico, por un aminoácido sin carga, como la glicina, la carga eléctrica neta de la proteína se alterará. Esta diferencia en carga se puede detectar como un cambio en el ritmo en el que las proteínas migran en un campo eléctrico. Hacia mediados de 1960, John Hubby y Richard Lewontin utilizaron la electroforesis en gel para medir la variación proteica en poblaciones naturales de *Drosophila*, y Harry Harris utilizó la misma técnica para medir la variación en la especie humana. En los siguientes años, los investigadores han utilizado la técnica para estudiar la variación genética en una amplia serie de organismos (Tabla 26.1), aunque posteriormente las técnicas desarrolladas para el DNA han sustituido en muchos casos el uso de la electroforesis en enzimas.

Las distintas formas electroforéticas de una proteína producidas por alelos distintos se denominan *alozimas*. Como se muestra en la tabla, un sorprendentemente grande porcentaje de loci examinados de diversas especies presenta alozimas distintas. De las poblaciones de la lista, se examinaron aproximadamente 30 loci por especie y cerca del 30 por ciento de los loci eran polimórficos, con un promedio del 10 por ciento de heterozigotos alozímicos por genoma diploide. Estas estimas apoyan claramente la idea de que los genotipos de los organismos albergan una amplia cantidad de variabilidad basada en el DNA.

Estos valores son aplicables solo a la variación genética detectable por la migración alterada de proteínas en un campo eléctrico. La electroforesis probablemente detecta solo el 30 por ciento de la variación real debida a sustituciones de aminoácidos, ya que muchas sustituciones no cambian la carga eléctrica neta de la molécula. Richard Lewontin estimó que cerca de las dos terceras partes de todos los loci de una población son polimórficos. En cualquier individuo de una población, cerca de la tercera parte de los loci presentan variación genética en forma de heterozigosis. El significado de la variación detectada por electroforesis es controvertida. Algunos arguyen que las alozimas son equivalentes funcionalmente y por consiguiente no tienen ningún papel en la evolución adaptativa. Trataremos este argumento más tarde en esta sección.

Variación en la secuencia de nucleótidos

La forma más directa para estimar la variación genética es comparar las secuencias nucleotídicas de los genes de individuos de una población. Con el desarrollo de técnicas para clonar y secuenciar el DNA, y con la proliferación de proyectos genoma, las variaciones de la secuencia nucleotídica ha sido catalogada en un número creciente de genes y genomas. En uno de los primeros estudios, Alec Jeffreys utilizó enzimas de restricción para detectar polimorfismo en 60 individuos no emparentados. Su objetivo fue estimar el número total de variantes en la secuencia de DNA de la especie humana. Sus resultados demostraron que en el grupo de genes de la β-globina, 1 de cada 100 pares de bases demostraba variación polimórfica. Si dicha región es representativa del genoma, este estudio indica que son posibles al menos 3×10^7 variantes de nucleótidos por genoma.

En otro estudio, Matin Kreitman examinó el locus *alcohol deshidrogenasa* (*Adh*) de *Drosophila melanogaster* (Figura 26.2). Este locus codifica para dos variantes alozímicas: los alelos *Adh-f* y *Adh-s*. Estas difieren en un solo aminoácido (thr versus lys en el codón 192). Para determinar si la cantidad de variación genética detectable en la proteína (diferencia en un aminoácido) se corresponde con la variación de nucleótidos, Kreitman clonó y secuenció el loci *Adh* de cinco poblaciones naturales de *Drosophila*.

Los 11 loci clonados tenían 43 variantes nucleotídicas respecto de la secuencia consenso de la *Adh* de 2721 pares de bases. Estas variaciones se distribuyen por todo el gen: 14 en exones codificantes, 18 en intrones y 11 en regiones no traducidas y flanqueantes. De las 14 variantes en las regiones codi-

TABLA 26.1 HETEROZIGOTOS ALOZÍMICOS A NIVEL PROTEICO

Especies	Poblaciones estudiadas	Loci examinados	Loci polimórficos* por población (%)	Heterozigotos por Locus (%)
Homo sapiens (humanos)	1	71	28	6,7
Mus musculus (ratón)	4	41	29	9,1
Drosophila pseudoobscura (mosca de la fruta)	10	24	43	12,8
Limulus polyphemus (cangrejo bayoneta)	4	25	25	6,1

* Un locus polimórfico es aquel que alberga mas de un alelo en una población.

Fuente: según Lewontin, 1974, p. 117.

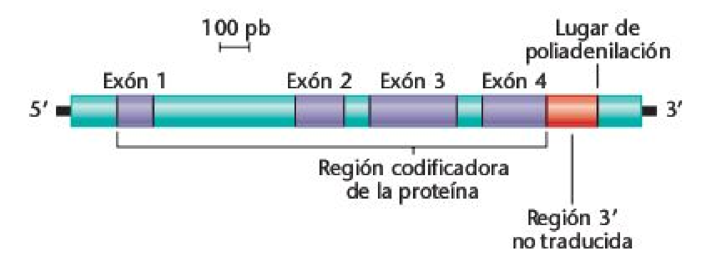


FIGURA 26.2 Organización del locus *Adh* de *Drosophila melanogaster*.

ficantes, solo una da lugar a la sustitución de un aminoácido —el del codón 192, que da lugar a las dos variantes electroforéticas observadas. Las otras 13 sustituciones nucleotídicas en la región codificante no dan lugar a sustituciones de aminoácidos. Las diferencias en el número de alozimas y de variantes nucleotídicas ¿son el resultado de la selección natural? Si es así, ¿qué significado tiene este hecho? Examinemos estas cuestiones.

Entre los loci más intensamente estudiados hasta la fecha se encuentra el locus que codifica al regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Las mutaciones recesivas de pérdida de función en el locus *CFTR* dan lugar a la **fibrosis quística**, una enfermedad cuyos síntomas incluyen piel salada y producción en exceso de mucus espeso en los pulmones, que da lugar a la susceptibilidad a infecciones bacterianas. Los genéticos han examinado el locus *CFTR* en unos 30.000 cromosomas de individuos con fibrosis quística y han encontrado más de 500 mutaciones diferentes que ocasionan la enfermedad. Entre estas mutaciones se encuentran mutaciones con cambio de sentido, deleciones de aminoácidos, mutaciones sin sentido, mutaciones con cambio en la pauta de lectura y defectos de rotura y reunión.

La Figura 26.3 muestra un mapa de los 27 exones del locus *CFTR*, con muchos exones identificados por su función. El histograma encima del mapa muestra la localización de algunas de las mutaciones que causan la enfermedad y el número de copias que se ha encontrado para cada una. Un sola mutación, una deleción de 3 pares de bases en el exón 10, llamada Δ*F*508, explica el 67 por ciento de todos los alelos mutantes para la fibrosis quística, pero otras mutaciones se encuentran en al menos 100 de los cromosomas analizados. En poblaciones de ascendencia europea, de 1 entre 44 a 1 entre 20 individuos son portadores heterozigotos de alelos mutantes. Advierta que la Figura 26.3 incluye solo las variantes de la secuencia que alteran la función de la proteína CFTR. Indudablemente, hay muchos más alelos *CFTR* con variantes silenciosas de la secuencia que no cambian la estructura de la proteína y que no afectan a su función.

Estudios en otros organismos, como ratas, ratones y la mostaza *Arabidopsis thaliana* han dado estimaciones similares de diversidad de nucleótidos en varios genes. Estos estudios indican que hay un enorme reservorio de variabilidad genética en la mayoría de las poblaciones y que, al nivel del DNA, muchos genes, y quizás todos, presentan diversidad de individuo a individuo.

Ahora resuelva esto

En el Problema 26.11 de la página 774 se le pregunta qué tipos de sustituciones nucleotídicas no se detectarán mediante estudios electroforéticos de proteínas.

Sugerencia: La detección de enzimas en geles se basa en la conversión de su sustrato natural. Las alozimas que migran a velocidades diferentes en la matriz del gel lo hacen así debido a que su carga es variable.

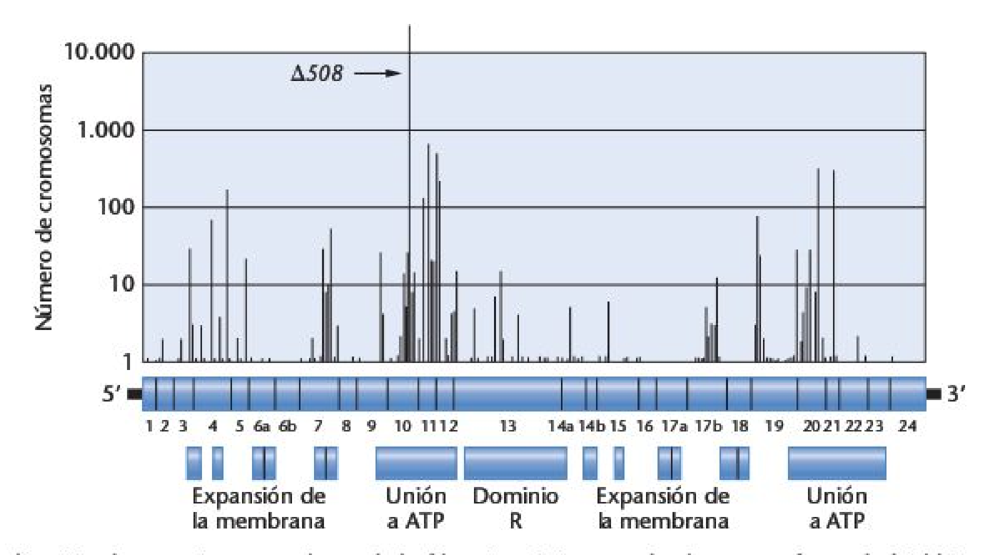


FIGURA 26.3 Localización de mutaciones en el gen de la fibrosis quística que dan lugar a enfermedad. El histograma muestra el número de copias de cada mutación que han encontrado los genéticos. (El eje vertical se representa en escala logarítmica.) El mapa genético debajo del histograma muestra la localización y tamaños relativos de los 27 exones del locus *CFTR*. Las cajas en la parte inferior indican las funciones de los diferentes dominios de la proteína CFTR.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Como se determina la cantidad de variación genética que existe en una población?

Explicación del alto nivel de variación genética en poblaciones

Como se mencionó anteriormente, el descubrimiento de que las poblaciones albergan una enorme cantidad de variación genética al nivel de los aminoácidos y de los nucleótidos fue una sorpresa para muchos biólogos evolutivos. Se estaba de acuerdo que la selección favorecía a un solo alelo óptimo (al tipo silvestre) en cada locus y que, por ello, las poblaciones tendrían que tener altos niveles de homozigosis. Esta expectativa fue evidentemente errónea, lo que dio lugar a muchas investigaciones y argumentos sobre las fuerzas que mantienen la variación genética.

Una opinión sobre el alto grado de variación genética propone que refleja principalmente la acción de la mutación y de la deriva. La **teoría neutralista** de la evolución molecular propuesta por Motoo Kimura, arguye que las mutaciones que dan lugar a sustituciones de aminoácidos son normalmente perjudiciales, con una fracción muy pequeña de favorables. Algunas mutaciones son neutras, o funcionalmente equivalentes al alelo que sustituyen. Aquellos polimorfismos que son favorables o perjudiciales se conservan o se eliminan de la población, respectivamente, por selección natural. Sin embargo, la frecuencia de los alelos neutros de una población vendrá determinada por la tasa de mutación y la deriva genética al azar. Algunas mutaciones neutras se fijarán por deriva en la población; otras mutaciones neutras se perderán. En un momento dado la población puede tener varios alelos neutros en un locus dado. Sin embargo, la diversidad de alelos en muchos loci polimórficos no refleja la acción de la selección natural, sino que es función del tamaño poblacional (las poblaciones grandes tienen más variación) y de la fracción de mutaciones que son neutras.

La explicación alternativa de la variación es la **selección natural**. Hay varios ejemplos en los que el polimorfismo enzimático o proteico se mantiene por adaptación a ciertas condiciones ambientales. La bien conocida ventaja de los heterozigotos para la anemia falciforme cuando se infectan de malaria es un ejemplo y otro se discutió en el Capítulo 25, cuando consideramos las pruebas de que el polimorfismo del locus *CFTR* puede reflejar la superioridad en eficacia de los heterozigotos en áreas en donde es común la fiebre tifoidea.

Las diferencias en eficacia de una fracción de un porcentaje sería suficiente para mantener un polimorfismo, pero esto sería difícil de medir. Por consiguiente, los datos normales son insuficientes para determinar qué parte de la variación genética molecular es neutra y qué parte está sujeta a selección. No obstante, la teoría neutral tiene una función importante: señala que algo de la variación genética se espera simplemente como consecuencia de la mutación y de la deriva, proporcionando una hipótesis de trabajo para estudiar la evolución molecular. En otras palabras, los biólogos tienen que encontrar evidencias positivas de que la selección está actuando sobre las frecuencias alélicas de un locus dado antes de poder rechazar la suposición más simple de que sólo la mutación y la deriva están actuando.

26.3 La estructura genética de las poblaciones cambia en el espacio y en el tiempo

Cuando los genéticos de poblaciones descubrieron que la mayoría de las poblaciones albergan una considerable diversidad genética, también encontraron que la estructura genética de las poblaciones varía en el espacio y en el tiempo. Para ilustrarlo consideremos los estudios en *Drosophila pseudoobscura* llevados a cabo por Theodosius Dobzhansky y sus colegas. Esta especie se encuentra en un amplio rango de hábitats, en el oeste y sudoeste de los Estados Unidos. Aunque las moscas a lo largo de este rango son similares morfológicamente, el grupo de Dobzhansky descubrió que las poblaciones de localidades diferentes variaban en la ordenación de los genes del cromosoma 3. Encontraron varias inversiones en este cromosoma que se pueden detectar por la formación de lazos en los cromosomas politénicos de las larvas. Cada inversión se denomina de acuerdo con la localidad en donde se descubrió (p.e., AR = Arrowhead, Columbia Británica, y CH = Montañas de Chiricahua, Arizona). Las secuencias de las inversiones se comparaban con una secuencia estándar, designada arbitrariamente ST.

En la Figura 26.4 se comparan las frecuencias de tres ordenaciones a diferentes altitudes en las montañas de Sierra Nevada en California. La ordenación ST es la más común en zonas bajas; a 2.500 metros, AR es la más común y ST la menos. En las poblaciones estudiadas, la frecuencia de la ordenación CH aumenta gradualmente con la altura, un fenómeno que proba-

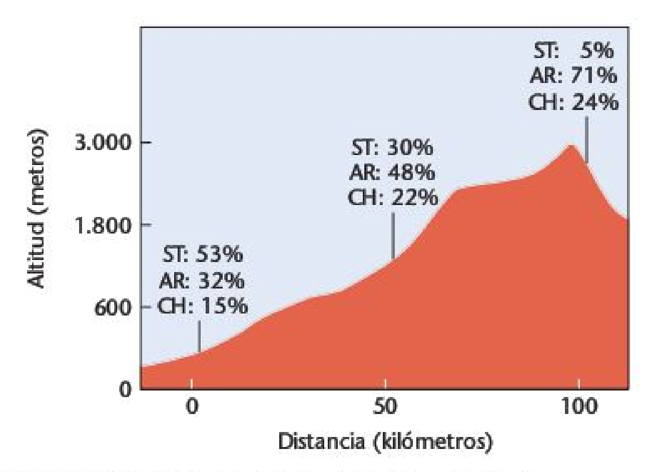


FIGURA 26.4 Inversiones en el cromosoma 3 de *D. pseudoobscura* a diferentes altitudes en Sierra Nevada, cerca del Parque Nacional de Yosemite.

blemente es el resultado de la selección natural y que va en paralelo con los cambios ambientales graduales que se dan al ir ascendiendo, como la disminución de la temperatura del aire.

El grupo de Dobzhansky también encontró que, en poblaciones capturadas en el mismo lugar a lo largo del año, las frecuencias de las inversiones también cambiaban. Es decir, con el cambio de las estaciones se producían variaciones cíclicas de las ordenaciones cromosómicas, como se muestra en la Figura 26.5. Tales variaciones se observaron repetidamente durante un periodo de varios años. La frecuencia de ST siempre disminuye en primavera, mientras que la de CH aumenta.

Para comprobar la hipótesis de que este cambio cíclico es una respuesta por selección natural, Dobzhansky y su grupo diseñó un experimento de laboratorio. Construyeron grandes cajas de poblaciones de donde se podían tomar periódicamente muestras de *D. pseudoobscura* para su estudio. Comenzaron con una población con el 88 por ciento de CH y el 12 por ciento de ST. Las moscas se mantuvieron a 25 °C y se muestrearon durante un año. Como se muestra en la Figura 26.6, la frecuencia de ST aumenta gradualmente hasta alcanzar un nivel del 70 por ciento. En dicho punto se alcanza un equilibrio entre ST y CH. Cuando se realizó el mismo experimento a 16 °C, no hubo cambios en las frecuencias de las inversiones. Los investigadores concluyeron que el equilibrio alcanzado a 25 °C era en respuesta a la temperatura elevada, la única variable del experimento.

Los resultados del estudio indican que un equilibrio en las frecuencias de las dos inversiones y de las ordenaciones de genes que contienen es superior a cualquiera de las inversiones por separado. El equilibrio alcanzado en el experimento probablemente representa la eficacia media más alta de la población en las condiciones controladas del laboratorio. Esta interpretación del experimento sugiere que la selección natural es una fuerza que mantiene la diversidad de las inversiones del cromosoma 3.

En estudios más extensos, Dobzhansky y sus colegas tomaron muestras de poblaciones de *D. pseudoobscura* a lo largo de un amplio rango geográfico. Encontraron 22 ordenaciones cromosómicas distintas en poblaciones de 12 localidades. En la Figura 26.7 se muestran las frecuencias de cinco de estas inversiones de acuerdo con su localización geográfica. Las diferencias son en gran parte cuantitativas, y la mayoría de las poblaciones difieren sólo en las frecuencias relativas de las inversiones. En conjunto, los datos de Dobzhansky demuestran

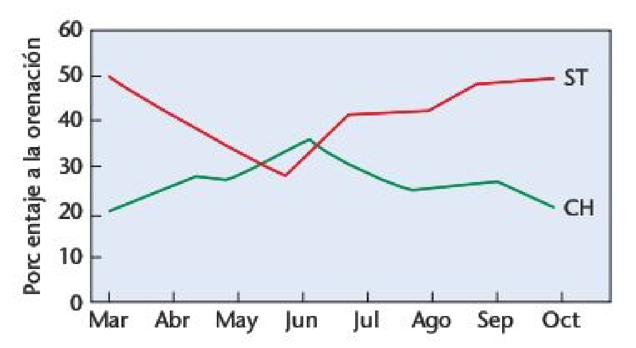


FIGURA 26.5 Cambios en las ordenaciones ST y CH en *D. pseudoobscura* a lo largo del año.

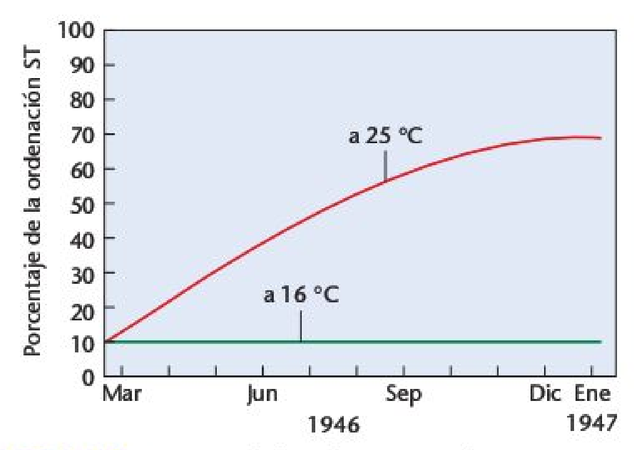


FIGURA 26.6 Aumento de la ordenación ST de *D. pseudoobscura* en cajas de poblaciones en condiciones de laboratorio.

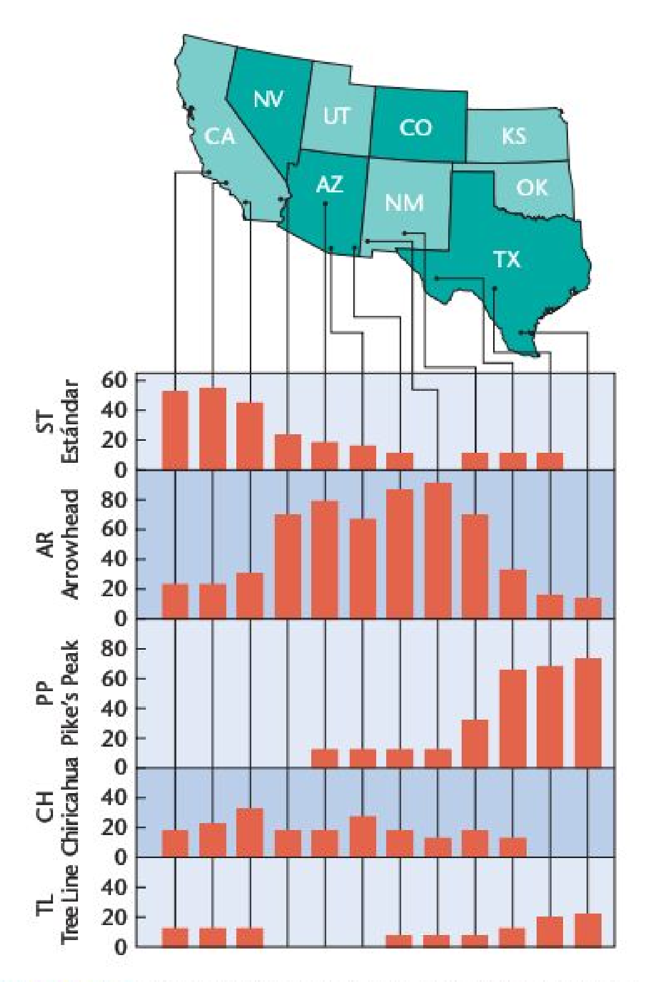


FIGURA 26.7 Frecuencias relativas (en porcentajes) de cinco inversiones cromosómicas de *D. pseudoobscura* en regiones geográficas diferentes

que la estructura genética de las poblaciones de *D. pseudoobscura* cambia de una localidad a otra y de un tiempo a otro. Al menos algo de esta variación de la estructura genética de la población es el resultado de la selección natural.

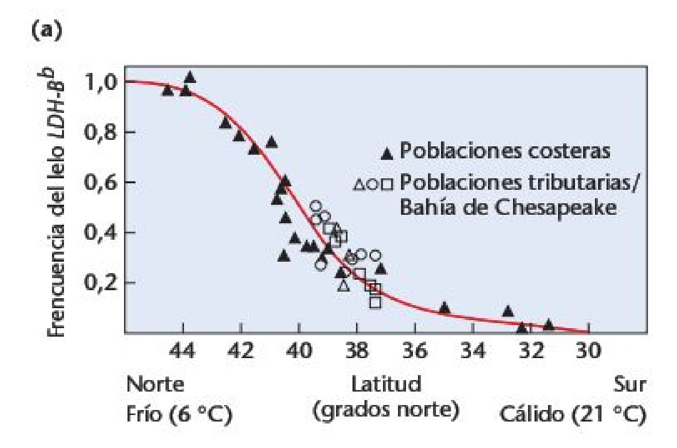
Otro ejemplo de cómo la estructura genética de una especie varía entre poblaciones lo proporciona el trabajo de Dennis A. Powers y Patricia Schulte sobre el mummichog (*Fundulus heteroclitus*), un pequeño pez (de 5 a 10 cm de longitud) que vive en ensenadas, bahías y estuarios a lo largo de la costa atlántica de Norteamérica, desde Florida hasta Terranova. Estos investigadores midieron las frecuencias alélicas del locus que codifica la enzima lactato deshidrogenasa-B (LDH-B) que se encuentra en el hígado, corazón y músculo esquelético. La LDH-B convierte al lactato en piruvato y es por ello fundamental tanto en la producción de glucosa como en el metabolismo aerobio. En los geles se ven dos alozimas de la LDH-B; difieren en dos posiciones aminoacídicas. Los alelos que codifican a las alozimas son la *Ldh-B^a* y la *Ldh-B^b*.

La frecuencia de los alelos *Ldh-B* varían espectacularmente en las poblaciones del mummichog [Figura 26.8(a)]. En las poblaciones del norte, en donde la temperatura media del agua es de unos 6 °C, predomina *Ldh-B^b*. En las poblaciones del sur, en donde la temperatura media del agua es de unos 21 °C, predomina la *Ldh-B^a*. Entre los extremos geográficos las frecuencias alélicas son intermedias.

Para determinar si la variación geográfica de las frecuencias de los alelos *Ldh-B* se debe a la selección natural, Powers y Schulte estudiaron las propiedades bioquímicas de las alozimas LDH-B. Encontraron que la enzima que codifica la *Ldh-B^b* tiene mayor eficacia catalítica a bajas temperaturas, mientras que el producto génico de *Ldh-B^a* es más eficaz a temperaturas elevadas [Figura 26.8(b)]. Una mezcla de las dos formas tiene una eficacia intermedia en todas las temperaturas.

Además de las diferencias funcionales entre las alozimas LDH-B, los alelos *Ldh-B* tienen diferencias en las secuencias nucleotídicas de sus regiones reguladoras. Una de esas diferencias da lugar a que la tasa de transcripción del alelo *Ldh-B^b* es dos veces mayor que la del alelo *Ldh-B^a*. El resultado es que los peces del norte tienen una mayor concentración de la enzima LDH-B en sus células.

Las diferencias en la eficacia catalítica y en la tasa de transcripción de los dos alelos *Ldh-B* están de acuerdo con la hipótesis de que las poblaciones de mummichog están adaptadas a las temperaturas en las que viven. Los peces son poiquilotermos: su temperatura corporal está determinada por el ambiente. En general, las temperaturas corporales bajas hacen más lenta la tasa metabólica en los poiquilotermos. La tasa más alta de transcripción del alelo *Ldh-B^b* y la superior eficacia catalítica a bajas temperaturas de sus productos génicos parece que ayuda a los peces del norte a compensar la tendencia de su ambiente más frío a reducir su tasa metabólica. La superior eficacia catalítica a altas temperaturas y la menor tasa de transcripción asociada con el alelo *Ldh-B^a* parece que permite a los peces del sur economizar en los recursos empleados para la producción de glucosa y el metabolismo aerobio. De acuerdo con estas y otras evidencias, Powers y Schulte sugieren que las diferencias entre las poblaciones de mummichog en las frecuencias del alelo *Ldh-B* es el resultado de la selección natural.



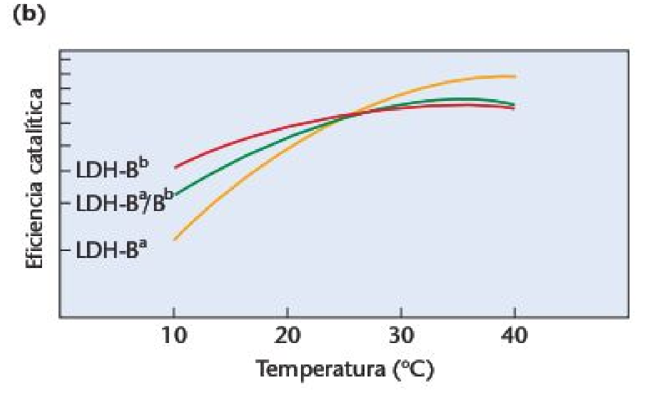


FIGURA 26.8 Variación de la estructura genética de las poblaciones de mummichog. (a) Frecuencia del alelo B^b en poblaciones a lo largo de la costa atlántica de América del Norte. (b) Eficiencia catalítica de las alozimas LDH-B en función de la temperatura.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Qué pruebas se han obtenido en estudios de laboratorio que indican que la selección natural es la causa de las diferencias genéticas entre poblaciones naturales de una especie?

26.4 La definición de especie es un gran reto para la biología evolutiva

Los procesos genéticos que actúan en poblaciones cambiándolas en el espacio y en el tiempo pueden dar lugar a la transformación y escisión de linajes, conduciendo finalmente a la

especiación. Sin embargo es difícil determinar el momento exacto de cuando se forma una especie nueva, parcialmente debido a nuestra dificultad en definir que es una especie. Charles Darwin, que desconocía las bases genéticas subyacentes de la diferencia entre especies, se basó en un planteamiento morfológico para definir la especie, según la cual las especies íntimamente emparentadas se separan por huecos en los valores de los caracteres morfológicos. Este planteamiento es útil tanto con especies actuales como con aquellos que conocemos solo por el registro fósil, pero también tiene varios problemas. Incluso dentro de especies reconocidas, a menudo hay grandes separaciones en los valores de los caracteres e, inversamente, hay muchos ejemplos de especie muy similares morfológicamente que no obstante no pueden cruzarse y por ello son especies distintas.

Los problemas con el planteamiento morfológico y de nuestra creciente comprensión de la genética de poblaciones y de la evolución, condujo a un nuevo concepto de especie hacia mediados del siglo XX, llamado concepto biológico de especie. En esta perspectiva, una especie se define como un *grupo de poblaciones que se pueden cruzar real o potencialmente y que en la naturaleza están reproductivamente aisladas de todos los otros grupos*. Como tal, la especie tiene un conjunto de genes distintos, por lo que la especiación ocurre cuando un conjunto de genes se divide en dos o más conjuntos de genes separados. También pueden darse cambios en la morfología, fisiología y adaptación a un nicho ecológico, pero no son componentes que se consideren necesarios para la especiación, que puede tener lugar gradualmente o en pocas generaciones.

En particular los zoólogos favorecen el concepto biológico de especie ya que se aplica fácilmente a los animales, muchos de los cuales tienen sexos separados e intercambian genes por reproducción sexual. Sin embargo, esta interpretación también tiene problemas. Muchas especies, como los procariotas, no se reproducen sexualmente, por lo que los individuos de una especie no se cruzan entre si. No obstante, esta claro que estos individuos no son todos especies distintas. Además, cerca del 20 por ciento de los vegetales y del 10 por ciento de las aves y mariposas hibridan fácilmente, aunque son reconocidas como especies distintas y muchos vegetales se autofecundan regularmente. La presencia en los genomas de genes que resultan de transferencia génica horizontal también sugiere que la hibridación no es algo raro y este es un argumento en contra de la definición de especie exclusivamente por el aislamiento reproductivo. Así mismo, es imposible utilizar el concepto biológico de especie para especies extinguidas ya que no somos capaces de determinar la presencia de aislamiento reproductivo en los fósiles. Incluso en las especies actuales puede ser imposible comprobar el aislamiento reproductivo en una serie de posibles especies íntimamente emparentadas.

En la práctica, muchos taxonomistas (aquellos científicos que describen las especies y estudian sus relaciones evolutivas) se basan en el tipo de características morfológicas que Darwin puso de relieve. Con el advenimiento de la genética moderna, a estos datos se puede añadir una gran riqueza de nueva información molecular y de secuencias que incrementa nuestra capacidad para identificar especies distintas a través de las características físicas. Esto ha producido un tercer tipo de concepto de especie basado en la filogenia, que argumenta que una especie está formada por aquellos organismos que son monofiléticos y comparten una o más características únicas derivadas. Este planteamiento tiene también sus problemas, ya que no podemos estar seguros de haber determinado correctamente las relaciones entre todos los posibles parientes de una filogenia a fin de identificar clados monofiléticos.

Finalmente, algunos biólogos utilizan un concepto ecológico de especie, en el que las especies se definen como un grupo de individuos que viven en el mismo tipo de ambiente y han compartido necesidades ecológicas, ocupando el mismo nicho. El principal problema aquí es que hay ejemplos en los que poblaciones que parecen ser de la misma especie (es decir, se cruzan fácilmente entre sí) ocupan nichos muy distintos.

La comunidad científica está comprometida en seguir discutiendo sobre la definición especie. Es una de las cuestiones más importantes y desafiantes en biología evolutiva, pero puede que no tenga una respuesta clara. En la situación actual, los biólogos utilizan la definición de especie más próxima y útil a su propio campo de investigación científica. El concepto biológico de especie está más íntimamente relacionado con los mecanismos genéticos poblacionales de evolución. Su énfasis en el aislamiento reproductivo no solo ayuda a definir las especies, sino que también proporciona un enfoque para pensar acerca del proceso de especiación. Si es necesario o no un aislamiento reproductivo completo para separar taxonómicamente una especie de otra, esta claro que una reducción del flujo génico entre poblaciones es una fuerza evolutiva poderosa.

Ahora resuelva esto

En el Problema 26.4 de la página 774 se le pregunta como se pueden identificar especies similares fenotípicamente como especies distintas, en lugar de una misma especie con algo de variación fenotípica.

Sugerencia: El concepto de especie en el que confíe influirá en la respuesta a esta pregunta.

26.5 Una reducción del flujo génico entre poblaciones, acompañada de selección divergente o deriva genética, puede dar lugar a especiación

Hemos aprendido que muchas poblaciones albergan considerable variación genética y que poblaciones diferentes dentro de una especie pueden tener alelos o frecuencias alélicas distintas

en una serie de loci. La divergencia genética de estas poblaciones se puede deber a selección natural, deriva genética o ambas. En el Capítulo 25 vimos que la migración de individuos entre poblaciones, junto con el flujo génico que acompaña a la migración, tiende a homogeneizar las frecuencias alélicas entre poblaciones. En otras palabras, la migración contrarresta la tendencia de las poblaciones a divergir.

Cuando el flujo génico entre poblaciones se reduce o se interrumpe, las poblaciones pueden divergir hasta el punto de que los miembros de una población no puedan cruzarse con éxito con miembros de la otra. Cuando las poblaciones alcanzan el punto en el que están reproductivamente aisladas, se convierten en especies distintas, de acuerdo con el concepto biológico de especie.

Las barreras biológicas que evitan o reducen el cruce entre poblaciones se llaman **mecanismos de aislamiento reproductivo**, clasificados en la Tabla 26.2. Estos mecanismos pueden ser ecológicos, fisiológicos, de comportamiento, estacionales, o temporales, o mecánicos.

Los **mecanismos de aislamiento prezigótico** evitan que los individuos se apareen. Individuos de poblaciones distintas pueden no encontrarse en el momento adecuado, pueden no reconocerse como pareja o pueden intentar cruzarse, pero encontrar que no son capaces de hacerlo.

Los **mecanismos de aislamiento postzigótico** dan lugar a aislamiento reproductivo aun cuando los miembros de dos poblaciones sean capaces de cruzarse entre sí. Por ejemplo, la diversidad genética puede haber alcanzado el estadio en donde la viabilidad o fertilidad de los híbridos es reducida. Se pueden formar los zigotos híbridos, pero todos o casi todos pueden ser inviables. Alternativamente, los híbridos pueden ser viables, pero estériles o sufrir fertilidad reducida. Incluso los mismos híbridos pueden ser fértiles, pero su descendencia puede tener viabilidad o fertilidad reducida. Estos mecanismos postzigóticos actúan en o más allá del nivel de zigoto y son originados por divergencia genética.

En algunos modelos de especiación, el aislamiento postzigótico evoluciona primero y le sigue un aislamiento prezigótico. Los mecanismos de aislamiento postzigótico desperdician gametos y zigotos y disminuyen la eficacia reproductiva de los híbridos supervivientes. Por consiguiente la selección favorecerá la propagación de los alelos que reducen la formación de los híbridos, dando lugar al desarrollo de mecanismos de aislamiento prezigóticos, que a su vez evitarán los cruces y la formación de zigotos híbridos y descendientes. En la evolución de los animales, el mecanismo prezigótico más afectivo es el aislamiento por comportamiento, concretamente el comportamiento de cortejo.

Los genes que controlan el desarrollo de los órganos reproductivos puede jugar un papel vital en la evolución de los principales nuevos linajes, incluso más allá de la especiación. Investigaciones recientes en *Arabidopsis thaliana* y otros taxones indican que los cambios evolutivos en la regulación y función de los genes de la caja homeótica MADS han sido una fuerza conductora en la evolución de la forma de la flor de las fanerógamas. Esto es clave para el aislamiento reproductivo y la divergencia, ya que la polinización exitosa y por consiguiente el cruce entre especies vegetales depende de una anatomía floral muy específica. Las investigaciones en el laboratorio en *A. thalina* por Vivian Irish y sus colegas se han

TABLA 26.2 **MECANISMOS DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO**

Mecanismo prezigóticos (evitan la fecundación y la formación del zigoto)

1. **Geográfico o ecológico:** Las poblaciones viven en la misma región, pero ocupan diferentes hábitats
2. **Estacional o temporal:** Las poblaciones viven en la misma región, pero maduran sexualmente en momentos distintos
3. **Conductual (solo animales):** Las poblaciones están aisladas por comportamientos diferentes e incompatibles antes del apareamiento
4. **Mecánico:** La fecundación cruzada se evita o se restringe por diferencias en las estructuras reproductoras (genitales en animales, flores en plantas)
5. **Fisiológico:** Los gametos no sobreviven en conductos reproductivos foráneos

Mecanismos postzigóticos (la fecundación tiene lugar y se forman zigotos híbridos, pero estos no son viables o dan lugar a híbridos débiles o estériles)

1. **Inviabilidad o debilidad de los híbridos**
2. **Esterilidad de los híbridos por el desarrollo:** Los híbridos son estériles debido a que las gónadas se desarrollan anormalmente o se interrumpe la meiosis antes de su finalización
3. **Esterilidad de los híbridos por la segregación:** Los híbridos son estériles debido a la segregación anormal hacia los gametos de cromosomas completos, fragmentos de cromosomas o combinaciones de genes
4. **Colapso de la F_2:** Los híbridos F_1 son normales, vigorosos y fértiles, pero en F_2 hay muchos individuos débiles o estériles

Fuente: según G. Ledyard Stebbins, *Processes of organic evolution*, 3rd ed., copyright 1977, p. 143. Reimpreso con el permiso de Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

centrado en los genes homeóticos florales APETALA3(AP3) y PISTILLATA(PI), que codifican el dominio MADS que tienen los factores de transcripción utilizados para determinar la identidad de estambres y pétalos en el desarrollo del anillo floral. Han demostrado que estos genes se expresan en cantidad diferentes en el periantio (pétalos/sépalos) de grupos de angiospermas con anatomía floral divergente. Este descubrimiento sugiere que simples cambios en la expresión de genes del desarrollo puede modificar la morfología floral evolutivamente. El grupo de Irish también ha investigado los cambios evolutivos en la función de estos genes. Cultivaron plantas transgénicas de *A. thaliana* con un mutante AP3 con su carboxilo-terminal sustituido por un motivo carboxilo-terminal ancestral «paleo AP3» obtenido de un linaje evolutivamente más antiguo que no produce pétalos en sus flores. (Habían demostrado que el motivo carboxilo-terminal es necesario para la función de las proteínas.) Las plantas transgénicas fabricaron estambres en sus flores, pero no pétalos, sugiriendo que la función del producto del gen de desarrollo cambiaba cuando el linaje que conduce a *A. thalina* divergía del linaje ancestral. La colaboración de biólogos evolutivos y genéticos del desarrollo ha dado lugar a nuevos descubrimiento estimulantes acerca del papel fundamental de la evolución molecular de los genes del desarrollo en los principales sucesos evolutivos, como el origen de nuevos linajes y especies.

Ejemplos de especiación

En esta sección consideraremos dos ejemplos de especiación, uno de estudios en el laboratorio y otro de estudios en la naturaleza. Diane Dodd y sus colegas estudiaron la evolución de la fisiología digestiva de *Drosophila pseudoobscura*. Recogieron moscas de una población silvestre y establecieron varias poblaciones distintas de laboratorio. Algunas de las poblaciones se cultivaron en un medio basado en almidón y otras en maltosa. Ambas fuentes alimenticias fueron muy estresantes para las moscas. Sólo después de varios meses de evolución por selección natural, las poblaciones se adaptaron a sus dietas artificiales y comenzaron a prosperar.

El equipo de Dodd quería saber si las poblaciones adaptadas al almidón y adaptadas a la maltosa, que divergían bajo selección fuerte y en ausencia de flujo génico, se habían convertido en especies distintas. Aproximadamente un año después de que las poblaciones se hubieran fundado, se realizaron una serie de cruces. En cada ensayo se situaron en una botella 48 moscas: 12 machos y 12 hembras de la población adaptada al almidón y 12 machos y 12 hembras de la población adaptada a la maltosa. Luego se anotó qué moscas se cruzaban.

El grupo de Dodd predijo que si las poblaciones adaptadas a medios distintos hubieran especiado, entonces las moscas preferirían cruzarse con miembros de sus propias poblaciones. Si las poblaciones no se hubieran especiado, entonces las moscas se cruzarían al azar. Los resultados aparecen en la Tabla 26.3. Unos 600 de los 900 apareamientos observados fueron entre machos y hembras de la misma población. En otras palabras, las poblaciones de moscas adaptadas de manera diferente demostraban un aislamiento parcial en el apareamiento. Dodd y sus colegas concluyeron que las poblaciones habían comenzado a especiarse, pero que no se había completado el proceso.

TABLA 26.3 **ESPECIACIÓN INCIPIENTE EN POBLACIONES DE LABORATORIO DE *DROSOPHILA PSEUDOOBSCURA* (NÚMERO DE CRUCES ENTRE CADA TIPO DE PAREJAS MACHO-HEMBRA)**

	Hembra	
	Adaptadas al almidón	**Adaptadas a la maltosa**
Macho		
Adaptadas al almidón	290	153
Adaptadas a la maltosa	149	312

Fuente: recopilado según Dodd, D.M.B. 1989. Reproductive isolation as a consequence of adaptive divergence in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 43:1308-11.

El istmo de Panamá, que se originó por un puente de tierra que conectó América del Norte y del Sur y al mismo tiempo separó el mar Caribe del Océano Pacífico, se formó hace unos tres millones de años. Nancy Knowlton y colegas se aprovecharon de un experimento natural que la formación del istmo de Panamá había llevado a cabo sobre varias especies de camarones saltadores (Figura 26.9). Después de identificar varias especies del Caribe, emparejaron cada una con una especie del Pacífico. Los miembros de cada pareja eran más similares entre sí en estructura y en apariencia que a cualquier otra especie de su propio mar. El análisis de las frecuencias de los alelos alozímicos y de secuencias del DNA mitocondrial confirmaron que los miembros de cada pareja eran parientes genéticos bastante próximos.



FIGURA 26.9 Un camarón saltador (género *Alpheus*).

La interpretación de estos datos del grupo de Knowlton es que, antes de la formación del istmo, los antecesores de cada pareja eran una sola especie. Cuando el istmo se formó, cada una de las siete especies ancestrales quedó dividida en dos poblaciones distintas, una en el Caribe y otra en el Pacífico.

Reunidas por primera vez después de tres millones de años en una placa de Petri en el laboratorio de Knowlton ¿se reconocerían los miembros del par de especies del Caribe y del Pacífico como pareja adecuada? Knowlton situó machos y hembras de un par de especies juntas y observó su comportamiento. Luego calculó la inclinación relativa de las parejas Caribe-Pacífico a aparearse respecto de las parejas Caribe-Caribe o Pacífico-Pacífico. Para tres de los siete pares de especies, las parejas transoceánicas rehuyeron cruzarse. En los otros cuatro pares de especies, las parejas transoceánicas presentaron una probabilidad del 33, 45, 67 y 86 por ciento para aparearse respecto del las parejas del mismo océano. De las parejas del mismo océano que se aparearon, el 60 por ciento dio lugar a huevos viables. De las parejas transoceánicas que se cruzaron, solo un 1 por ciento dio lugar a huevos viables. Podemos concluir de estos resultados que 3 millones de años de separación han dado lugar a una especiación completa o casi completa, con fuertes mecanismos de aislamiento pre- y postzigótico en los siete pares de especies.

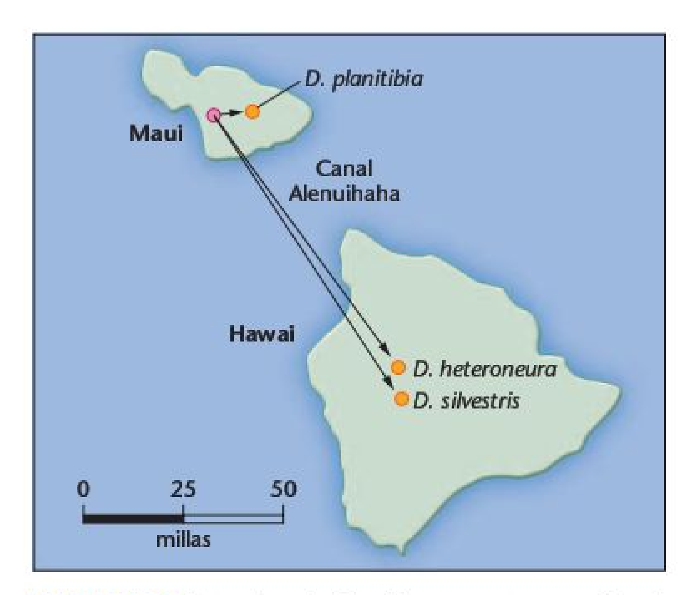


FIGURA 26.10 Rutas de colonización propuestas para Hawai por miembros de especies de *D. planitibia*. El círculo púrpura representa a la población ancestral de las tres especies actuales.

Divergencia genética mínima necesaria para la especiación

¿Cuánta separación genética se necesita entre dos poblaciones antes de que se conviertan en especies distintas? Consideraremos dos ejemplos, uno de un insecto y otro de una planta que demuestran que en algunos casos la respuesta es «no demasiada».

Los investigadores estiman que *Drosophila heteroneura* y *D. silvestris*, que solo se encuentran en la isla de Hawai, divergieron de una especie ancestral común hace solo 300.000 años. Se piensa que las dos especies descienden de *D. planitibia* que colonizo Hawai desde la más antigua isla de Maui (Figura 26.10). Las dos especies están claramente separadas por cortejos y comportamientos de apareamiento (un mecanismo de aislamiento prezigótico) diferentes e incompatibles, morfológicamente y por la pigmentación corporal y de las alas (Figura 26.11).

A pesar de su divergencia morfológica y de comportamiento, es difícil demostrar diferencias significativas entre estas especies en los patrones de inversiones cromosómicas o en el polimorfismo proteico. Estudios de hibridación de DNA llevados a cabo en las dos especies indican que la diversidad en la secuencia entre ellas es solo del 0,55 por ciento (Figura 26.12). Así, la diversidad en secuencia nucleotídica puede preceder al desarrollo del polimorfismo proteico o cromosómico.

Las pruebas genéticas sugieren que las diferencias entre *D. heteroneura* y *D. silvestris* están controladas por un número relativamente pequeño de genes. Por ejemplo, solo de 15 a 19 loci pueden ser los responsables de las diferencias morfológicas entre las dos especies, demostrando que el proceso de especiación implica probablemente a un pequeño número de genes.

(a)

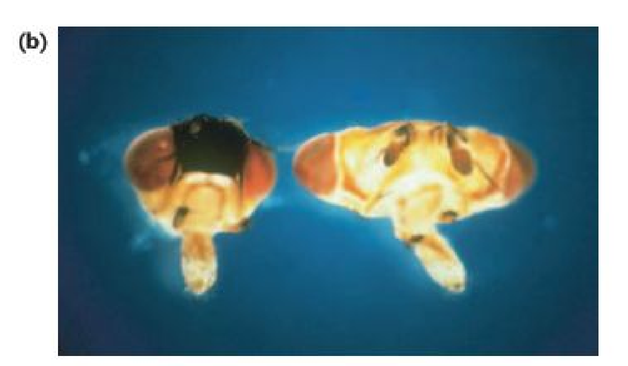
(b)


FIGURA 26.11 (a) Diferencias en los patrones de pigmentación de *D. silvestris* (izquierda) y *D. heteroneura* (derecha). (b) Morfología de la cabeza de *D. silvestris* (izquierda) y *D. heteroneura* (derecha).

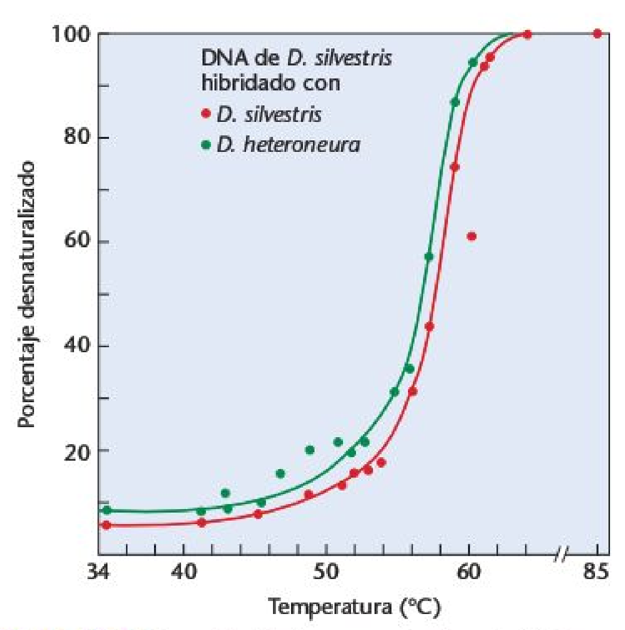


FIGURA 26.12 Diversidad de la secuencia de nucleótidos en el complejo de especies de *Drosophila planitibia*. El desplazamiento hacia la izquierda de los híbridos heterólogos indica el grado de divergencia de la secuencia nucleotídica.

Estudios utilizando dos especies íntimamente relacionadas de catasetos, una planta que crece en las Montañas Rocosas y en áreas occidentales, confirma que las especies se pueden separar por solo unas pocas diferencias genéticas. Una especie, *Mimulus cardinalis*, es polinizada por colibríes y no se cruza con *Mimulus lewisii*, que es polinizada por abejorros. H.D. Bradshaw y sus colegas han estudiado las diferencias genéticas relacionadas con la reproducción en las dos especies —es decir, forma, tamaño, color y producción de néctar de la flor. Para cada carácter, una diferencia en un solo gen proporciona al menos el 25 por ciento de la variación observada entre los híbridos obtenidos en el laboratorio. *M. cardinalis* produce 80 veces más néctar que *M. lewisii*, y un solo gen es responsable de al menos la mitad de la diferencia. Un solo gen controla también una gran parte de las diferencias en el color de la flor entre las dos especies (Figura 26.13). En este caso, como en el de la *Drosophila* de Hawai, las diferencias entre las especies se pueden reducir a un pequeño número de genes.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se puede determinar la divergencia genética mínima entre dos especies?

Al menos en algunos casos la especiación es rápida

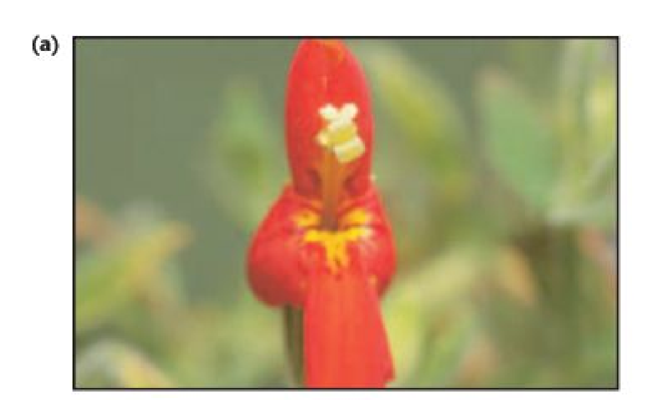
¿Cuánto tiempo se requiere para la especiación? En muchos casos, la especiación tiene lugar lentamente, durante un largo periodo. Sin embargo, en otros casos, la especiación puede ser sorprendentemente rápida.

En los lagos del Rift Valley de África oriental, hay cientos de especies de peces cíclidos. Por ejemplo, el lago Victoria (Figura 26.14), tiene más de 400 especies. Los cíclidos tiene alguna diversidad morfológica pero, lo más importante, es que están altamente especializados para nichos diferentes (Figura 26.15). Algunos comen algas que flotan en la superficie del agua, mientras que otros comen en el fondo, o se alimentan de insectos, o de moluscos o son predadores de otras especies de peces. El lago Tanganika tiene una serie similar de especies. Los análisis genéticos indican que las especies de un lago dado están todas más íntimamente relacionadas entre sí que con especies de otros lagos. Esto implica que la mayoría o todas las especies de un lago, por ejemplo el Tanganika, son descendientes de un único antecesor común y que evolucionaron dentro del lago en donde se encuentran.

El lago Victoria tiene entre 250.000 y 750.000 años y hay evidencias de que el lago pudo haberse secado casi completamente hace menos de 14.000 años. ¿Es posible que las 400 especies actuales del lago evolucionaran de una especie ancestral común en menos de 14.000 años?

En un estudio sobre el origen de los cíclidos del lago Tanganika, Norihiro Okada y colegas examinaron la inserción de una nueva familia de secuencias de DNA de elementos interdispersos cortos (SINES) (discutidos en el Capítulo 12) en

(a)



(b)



FIGURA 26.13 Flores de dos especies íntimamente emparentadas de catasetos, (a) *Mimulus cardinalis* y (b) *Mimulus lewisii*.



FIGURA 26.14 El lago Victoria del Rift Valley de África oriental está habitado por más de 400 especies de cíclidos.

el genoma de las especies de cíclidos del lago Tanganika. Los SINES son secuencias de DNA repetitivo, insertadas al azar en el genoma. Son un tipo de retroposón y la integración de un SINE en un locus es un suceso irreversible. Si un SINE se encuentra en el mismo locus del genoma de todas las especies examinadas, es una evidencia clara de que todas esas especies descienden de un antecesor común. Utilizando un SINE llamado AFC, el equipo de Okada analizó 33 especies de cíclidos que pertenecían a cuatro grupos (llamadas tribus de especies). En cada tribu, el SINE se encontraba en todos los sitios comprobados, indicando que las especies de cada tribu descienden de una sola especie ancestral (Figura 26.16). Si nuevas investigaciones utilizando SINES u otros marcadores moleculares dan lugar a resultados similares con las especies del lago Victoria, significaría que las 400 especies de cíclidos de este lago evolucionaron en menos de 14.000 años. Si se confirma, este hallazgo representaría la radiación evolutiva más rápida que nunca se ha documentado en vertebrados.

Mediante el mecanismo de la poliploidía es posible una especiación incluso más rápida. La formación de especies animales por poliploidía es rara, pero la poliploidía es un factor importante en la evolución vegetal. Se estima que la mitad de todas las fanerógamas han evolucionado por este mecanismo. Una forma de poliploidía es la alopoliploidía (véase el Capítulo 8), que se produce al doblarse el número de cromosomas en un híbrido formado por el cruce de dos especies.

Si dos especies de plantas relacionadas tienen la constitución genética SS y TT (en donde S y T representan la dotación haploide de cromosomas de cada especie), el híbrido tendría la constitución cromosómica ST. Normalmente, tal planta sería estéril, ya que hay pocas o ninguna pareja de cromosomas homólogos y aparecerían aberraciones en la meiosis. Sin embargo, si el híbrido sufre una duplicación espontánea del número de cromosomas, se produciría una planta tetraploide SSTT. Esta aberración cromosómica podría ocurrir en la mitosis en el tejido somático, dando lugar a una planta parcialmente tetraploide que daría lugar a algunas flores tetraploides. Alternativamente, una meiosis aberrante puede dar lugar a gametos ST que, cuando se fecunden, producirían zigotos SSTT. Las plantas SSTT serían fértiles porque poseerían cromosomas homólogos que producirían gametos viables ST. Esta nueva raza pura tetraploide tendría una combinación de características derivadas de las especies paternas y estaría aislada reproductivamente de ellas, ya que los híbridos serían triploides y por ello estériles.

La planta del tabaco *Nicotiana tabacum* ($2n = 48$) es el resultado de la duplicación del número de cromosomas del hí-





FIGURA 26.15 Cíclidos que ocupan una serie de nichos diversos, estando cada especie especializada por una fuente alimentaria distinta.

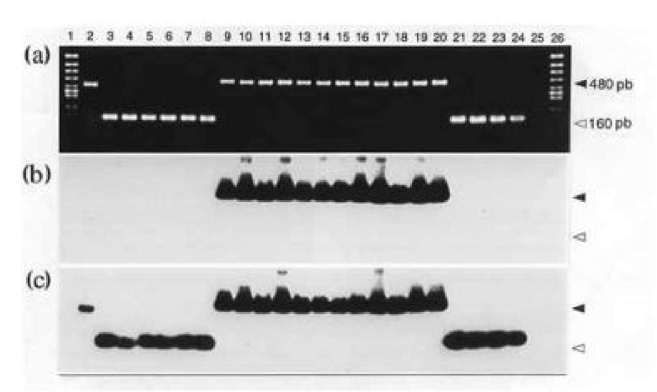


FIGURA 26.16 Utilización de secuencias de DNA repetitivo para seguir las relaciones entre especies de cíclidos del Lago Tanganika. (a) Fotografía de un gel de agarosa mostrando fragmentos de PCR generados a partir de cebadores que flanquean la familia AFC de SINES. Los grandes fragmentos que tiene esta familia se encuentran en todas las muestras de DNA genómico de los miembros de la tribu Lamprologini de cíclidos (carreras 9-20). El DNA de la especie de la carrera 2 tiene un fragmento similar, pero más corto, que puede representar otra secuencia repetitiva. El DNA de otras epecies (carreras 3-8 y 21-24) produce fragmentos cortos que no contienen SINE. (b) Transferencia Southern del gel de (a) con una sonda de DNA de la familia AFC de SINES. AFC se encuentra en el DNA de todas las especies de la tribu Lamprologini (carreras 9-20), pero no en el DNA de las otras especies (carreras 2-8 y 21-24). (c) Una segunda transferencia Southern del gel de (a) con una sonda de la secuencia genómica en la que se inserta el SINE AFC. Todas las especies examinadas (2-24) tienen la secuencia insertada. Los fragmentos grandes del DNA de Lamprologini (carreras 9-20) corresponden a aquellas de la transferencia previa que demuestran que el SINE está insertado en el mismo sitio en todas las especies de la tribu. En resumen, estos datos demuestran que el SINE AFC está presente sólo en los miembros de esta tribu, está presente en todos los miembros de las especies y está insertada en el mismo sitio en todos los casos. Estos resultados se interpretan como demostración de un origen común de las especies de la tribu en cuestión.

brido entre *N. otophora* ($2n = 24$) y *N. silvestris* ($2n = 24$) (Figura 26.17). El origen de *N. tabacum* es un ejemplo de especiación prácticamente instantánea.

Ahora resuelva esto

En el Problema 26.26 de la página 775 se le pide que interprete si los polimorfismos de secuencias neutras que se encuentran entre las especies de cíclidos en los lagos africanos ayudan a explicar su evolución.

Sugerencia: Si una secuencia es neutra, entonces no habría estado sujeta a ninguna forma de selección a lo largo del tiempo y habría estado sujeta solo a mutación al azar y deriva genética.



FIGURA 26.17 La planta cultivada del tabaco *Nicotiana tabacum* es el resultado de la hibridación entre otras dos especies.

26.6 Las diferencias genéticas entre poblaciones o especies se pueden utilizar para reconstruir su historia evolutiva

Al principio de este capítulo advertimos que el curso de la historia evolutiva implica la transformación de una especie en otra y la escisión de especies en dos o más especies nuevas. Nuestros ejemplos han demostrado que la especiación está asociada con cambios en la estructura genética de las poblaciones y con divergencia genética. Por consiguiente, seremos capaces de utilizar las diferencias genéticas entre especies para reconstruir sus historias evolutivas.

En uno de los primeros ejemplos de reconstrucción filogenético, W.M. Fitch y E. Margoliash reunieron datos sobre secuencias de aminoácidos del citocromo c de una serie de organismos. El **citocromo c** es un pigmento respiratorio que se encuentra en las mitocondrias de los eucariotas, y su secuencia de aminoácidos ha evolucionado muy lentamente. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos en humanos y chimpancés es idéntica, y humanos y mono rhesus muestran solo un aminoácido de diferencia. Esperaríamos poca evolución en una proteína cuya función propia es esencial para la eficacia, pero tal semejanza total es notable considerando que el registro fósil indica que los linajes que condujeron a los humanos y a los monos divergieron de una especie antecesora común hace unos 20 millones de años.

La columna (a) de la Tabla 26.4 presenta el número de diferencias de aminoácidos entre el citocromo c en humanos y en una serie de otras especies. La tabla esta muy de acuerdo con nuestra intuición acerca de cuan íntimamente emparentados estamos con esas otras especie. Por ejemplo, estamos más emparentados con otros mamíferos que con los insectos, y estamos más relacionados con los insectos que con los hongos. Igualmente, nuestro citocromo c difiere en 10 aminoácidos del de los perros, en 24 aminoácidos del de las polillas y en 38 aminoácidos del de la levadura.

Sin embargo, para cambiar un aminoácido dado se puede necesitar el cambio de más de un nucleótido. Cuando se contabilizan los cambios de nucleótidos necesarios para todas las diferencias de aminoácidos observadas en una proteína, se establece la **distancia mutacional mínima** entre los genes de cualesquiera dos especies. La columna (b) de la Tabla 26.4 muestra tal análisis de los genes que codifican al citocromo c. Como era de esperar, estos valores son mayores que el número correspondiente de aminoácidos que separan a los humanos de los otros nueve organismos de la tabla.

Fitch utilizó datos sobre la distancia mutacional mínima entre los genes del citocromo c de 19 organismos para reconstruir su historia evolutiva. El resultado es una estimación del árbol evolutivo, o filogenia, que une a las especies (Figura 26.18).

TABLA 26.4 DIFERENCIAS EN AMINOÁCIDOS Y DISTANCIA MUTACIONAL MÍNIMA ENTRE EL CITOCROMO C DE LA ESPECIE HUMANA Y OTROS ORGANISMOS

Organismo	(a) Diferencias en aminoácidos	(b) Distancia mutacional mínima
Humanos	0	0
Chimpancés	0	0
Mono Rhesus	1	1
Conejos	9	12
Cerdos	10	13
Perros	10	13
Caballos	12	17
Pingüinos	11	18
Polillas	24	36
Levadura	38	56

Fuente: según W.M. Fitch y E. Margoliash, Construction of phylogenetic trees, *Science* 155:279-84, 10 de enero de 1967. Copyright 1967 por la American Association for the Advancement of Science.

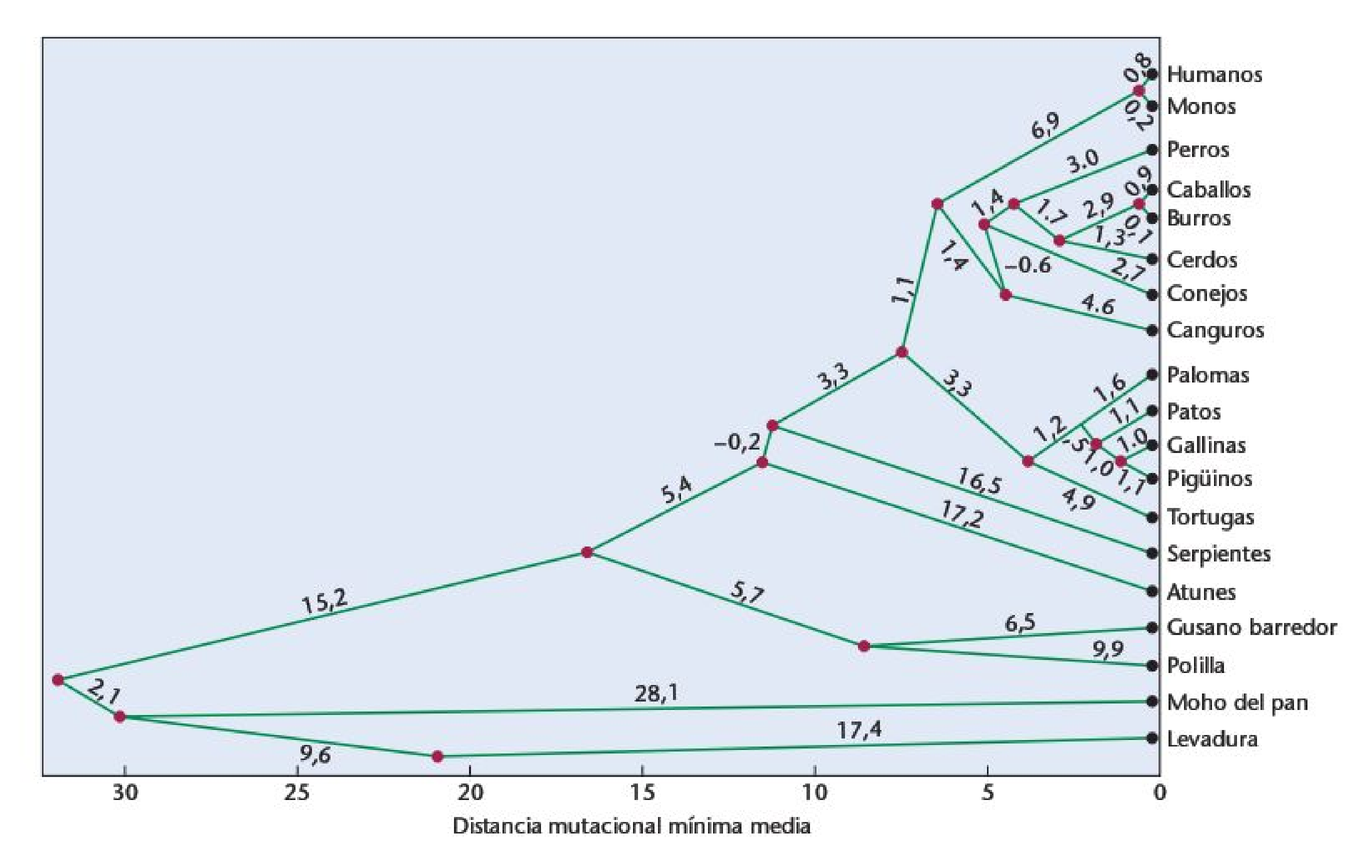


FIGURA 26.18 Filogenia construida comparando las secuencias de aminoácidos del citocromo c. *Reimpreso con el permiso de Fitch, W.M., and Margoliash E. 1967. Construction of phylogenetic trees. Science 155:279-84. Figure 2.* Copyright 1967 AAAS.

Los puntos negros de los extremos de las ramas representan a las especies actuales, que están conectadas con los antecesores comunes deducidos, representados por puntos rojos. Las especies ancestrales evolucionaron y divergieron para dar lugar a las especies actuales. Los antecesores comunes están conectados con otros antecesores comunes anteriores, culminando en un solo antecesor común para todas las especies del árbol, representado por el punto rojo en el extremo izquierdo.

Método para estimar árboles evolutivos de datos genéticos

Muchos métodos utilizan datos sobre diferencias genéticas para estimar filogenias. Está más allá del alcance de este capítulo revisarlos todos. Solo presentaremos un método, llamado emparejamiento no ponderado utilizando medias aritméticas, o UPGMA (**U**nweighted **P**air **G**roup **M**ethod using **A**rithmetic averages). Este método no es el más potente para estimar filogenias a partir de datos genéticos, pero, a pesar de su largo nombre, es intuitivamente directo. Además, el UPGMA funciona razonablemente bien en muchas circunstancias.

El punto de partida para el UPGMA es una tabla de distancias genéticas entre un grupo de especies [Figura 26.19(a)]. Para demostrar la técnica, utilizaremos datos de estudios de hibridación de DNA de Charles Sibley y Jon Alquist, que calcularon las distancias genéticas entre humanos y cuatro especies de antropoides: el chimpancé común, el gorila, el siamango y el gibón común.

El método utiliza los siguientes pasos:

1. Búsqueda de la distancia genética más pequeña entre cualquier par de especies. En la Figura 26.19(a), esta distancia es de 1,628, la distancia entre los humanos y el chimpancé. Una vez identificada, la pareja de especies correspondiente se sitúa en ramas vecinas de un árbol evolutivo [Figura 26.19(b)]. La longitud de cada brazo es la mitad de la distancia genética entre las especies (1,628/2) por lo que las ramas que conectan a humanos y chimpancés con su antecesor común queda en 0,81.
2. Se recalcula la distancia genética entre este par de especies y todas las demás [Figura 26.19(c)]. La distan-

(a)

	Humanos	Chimpancé	Gorila	Siamango	Gibón
Humanos	–				
Chimpancé	**1,628**	–			
Gorila	2,267	2,21	–		
Siamago	4,7	5,133	4,543	–	
Gibón	4,779	4,76	4,753	1,95	–

(c)

	Hu-Ch	Gorila	Siamango	Gibón
Hu-Ch	–			
Gorila	2,2385	–		
Siamago	4,9165	4,543	–	
Gibón	4,7695	4,753	**1,95**	–

(e)

	Hu-Ch	Gorila	Si-Gi
Hu-Ch	–		
Gorila	**2,239**	–	
Si-Gi	4,843	4,648	–

(g)

	Hu-Ch-Go	Si-Gi
Hu-Ch-Go	–	
Si-Gi	**4,778**	–

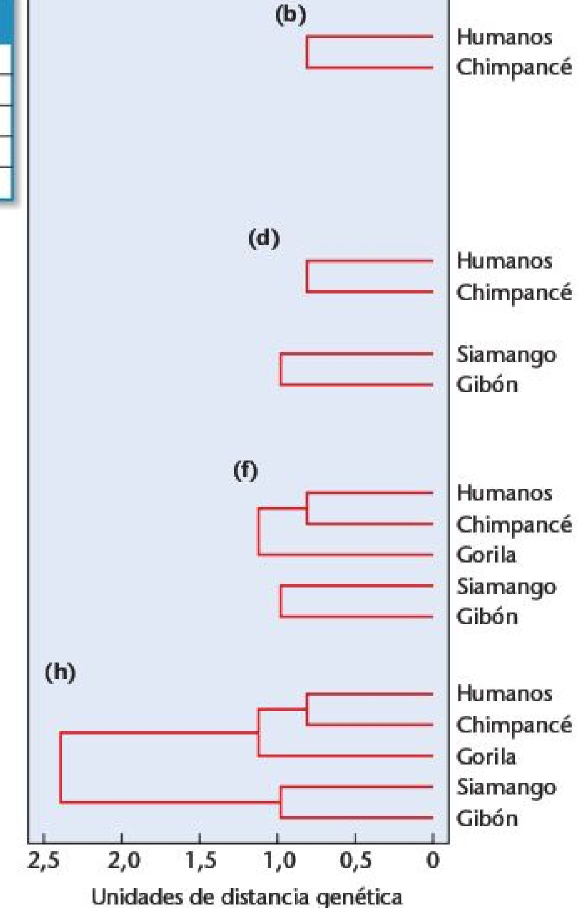


FIGURA 26.19 Reconstrucción filogenética mediante UPGMA.

cia genética entre el «grupo»[1] humanos-chimpancés (Hu-Ch) y las otras especies es el promedio de las distancias entre cada miembro del grupo y las otras especies. Por ejemplo, la distancia genética entre el grupo humanos-chimpancés y el gorila es el promedio de la distancia entre humanos y gorilas y entre chimpancés y gorilas, o

$$(2{,}267 + 2{,}21)/2 = 2{,}2385.$$

3. Se repiten los pasos 1 y 2 hasta que todas las especies se han añadido al árbol.

La distancia más pequeña en la tabla recalculada es 1,95, la distancia entre el siamango y el gibón [Figura 26.19(c)]. Para construir la siguiente sección del árbol, el siamango y el gibón se sitúan en ramas vecinas, con longitudes iguales a la mitad de 1,95, ó 0,98. [Figura 26.19(d)].

Recalculando la tabla encontramos ahora que hay dos grupos, más los gorilas [Figura 26.19(e)]. La distancia genética entre el grupo humanos-chimpancés y el grupo siamango-gibón es el promedio de cuatro distancias: humano-siamango, humano-gibón, chimpancé-siamango, chimpancé-gibón.

Ahora la distancia genética más pequeña es 2,239, la distancia entre el grupo humanos-chimpancés y los gorilas, por consiguiente añadimos en el árbol una rama para los gorilas y la conectamos con el antecesor común del grupo humanos-chimpancés [Figura 26.19(f)]. Las ramas se dibujan de tal manera que la distancia entre los extremos de cualesquiera dos ramas en el grupo humanos-chimpancés-gorilas sea 2,239.

Recalculando la tabla por último [Figura 26.19(g)], encontramos que la distancia genética entre el grupo humano-chimpancés-gorilas y el grupo siamango-gibón es el promedio de seis distancias genéticas: humanos-siamango, humanos-gibón, chimpancés-siamango, chimpancés-gibón, gorila-siamango y gorila-gibón. Esta distancia es 4,778, que nos permite completar nuestro árbol evolutivo [Figura 26.19(h)]. El árbol indica que los humanos y chimpancés son los parientes más próximos. Esto no quiere decir que los humanos evolucionamos de los chimpancés; más bien, que los humanos y chimpancés comparten un antecesor común más reciente que con otras especies del árbol.

El principal defecto del UPGMA es que no proporciona la manera de determinar lo bien que encajan los datos del árbol, comparados con otros árboles posibles. Por ejemplo, ¿cuánto mejor encajarían nuestros datos del árbol que hemos construido con un árbol que muestre a los chimpancés y gorilas como los parientes más próximos?

Los genéticos evolutivos han desarrollado varias técnicas para investigar la serie de todos los posibles árboles que conecten un grupo de especies y calcular el rendimiento relativo de cada uno. Una serie de técnicas, llamadas métodos de **parsimonia**, compara árboles utilizando el número mínimo de cambios evolutivos que cada uno requiere y luego seleccionar el árbol más simple posible. Sin embargo, a menudo hay una serie de árboles igualmente parsimoniosos, por lo que estos métodos tienen que combinarse a menudo con otros criterios para desarrollar la filogenia más exacta. Otra serie de herramientas analíticas, llamadas métodos de **máxima verosimilitud**, comienzan con un modelo de proceso evolutivo, calculan cuál es la probabilidad de que la evolución haya producido cada árbol posible de acuerdo con el modelo y selecciona el árbol más probable. Es importante tener en cuenta que una filogenia obtenida de datos de distancias genéticas no es necesariamente el modo en que las especies han evolucionado realmente, aunque es una estimación razonable de sus historias evolutivas, basadas en los métodos utilizados. Las filogenias basadas en grupos de datos combinados de varios loci son normalmente más fiables que las basadas en un solo locus.

Relojes moleculares

En muchos casos, nos gustaría estimar no solo qué miembros de una serie de especies están más íntimamente emparentados, sino también cuando vivieron sus antecesores comunes. A veces podemos hacerlo, gracias a los **relojes moleculares** —secuencias de aminoácidos o de nucleótidos en las que se acumulan los cambios evolutivos a una tasa constante con el tiempo.

La investigación de Walter M. Fitch y colegas sobre el virus A de la gripe muestra cómo se utilizan los relojes moleculares. Fitch y sus colegas secuenciaron parte del gen de la hematoglutinina del virus de la gripe que se habían aislado en momentos diferentes durante un periodo de 20 años. Calcularon el número de diferencias nucleotídicas entre los distintos virus y construyeron un árbol evolutivo [Figura 26.20(b)]. Muchas cepas se han extinguido sin dejar descendientes entre los virus aislados más recientemente. El grupo de Fitch representó gráficamente el número de sustituciones nucleotídicas entre los primeros virus y cada uno de los virus siguientes respecto del año en que los virus se aislaron [Figura 26.20(a)]. Todos los puntos caen cerca de una línea recta, indicando que las sustituciones nucleotídicas en este gen se han acumulado a una tasa constante. Así, el gen de la hematoglutinina sirve como un reloj molecular. Los relojes moleculares se utilizan para comparar las secuencias de nuevos virus de la gripe a medida que aparecen cada año y estimar el tiempo que ha pasado desde que divergieron de un antecesor común.

Los relojes moleculares deben de calibrarse cuidadosamente y utilizarse con precaución. Por ejemplo, los datos de Fitch indican que las cepas de la gripe A que saltaron de las aves a los humanos han evolucionado mucho más rápidamente que las cepas que han permanecido en las aves. Por ello, un reloj molecular calibrado para cepas de los virus humanos no tendría mucho sentido si se aplicara a las cepas de las aves.

[1] Decimos «grupo» aún cuando lo que realmente tenemos es una pareja; la razón es que podemos (y queremos) formar grupos mas grandes y es conveniente llamarlos con el mismo nombre mas inclusivo –ergo *grupo*.

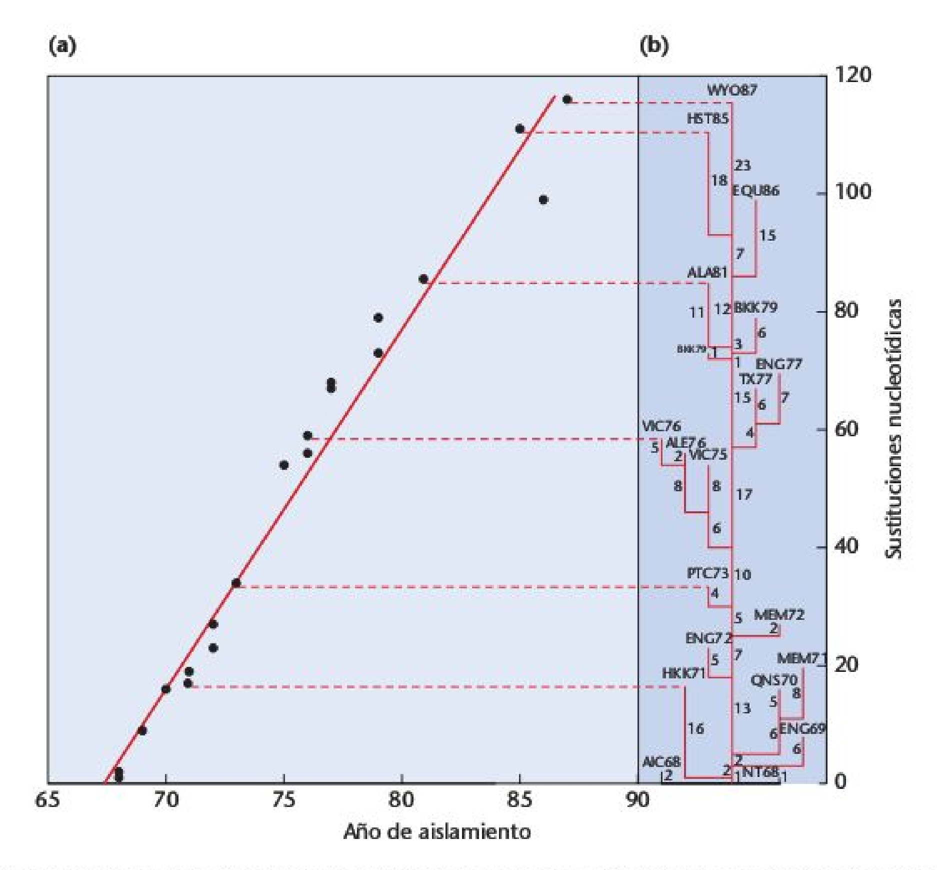


FIGURA 26.20 Reloj molecular del gen de la hematoglutinina de la gripe A. (a) Número de diferencias nucleotídicas entre el primer aislado y cada aislado siguiente en función del año de aislamiento. (b) Estima de la filogenia de los aislados.

¿CÓMO LO SABEMOS?

¿Cómo se puede determinar el último antecesor común compartido por dos especies divergentes?

26.7 La reconstrucción de las historias evolutivas nos permite contestar a varias cuestiones

Los análisis evolutivos plantean una amplia serie de cuestiones, algunas de las cuales están relacionadas directamente con la evolución, mientras que otras tratan de temas contemporáneos e incluso con la actividad criminal. Para concluir este capítulo, proporcionaremos respuestas a cuestiones planteadas en los escenarios expuestos al principio.

La transmisión del VIH desde un dentista a sus pacientes

Hacia finales de 1986 se comprobó que un dentista de Florida era VIH positivo. Varios meses después fue diagnosticado con SIDA. Continuó con la práctica de dentista dos años mas, hasta que uno de sus pacientes, una mujer joven, sin factores de riesgo conocidos, descubrió que ella también estaba infectada por el VIH. Cuando el dentista urgió públicamente a sus otros pacientes que se analizaran, se encontró que varios de ellos eran positivos para el VIH. ¿Transmitió el dentista a sus pacientes el VIH, o quedaron los pacientes infectados por otros medios?

A primera vista, esta situación parece muy alejada de una discusión de evolución; sin embargo, el paso de un virus de un individuo a otro es similar a la fundación de una nueva población en una isla por un pequeño número de migrantes. No hay flujo génico entre la población ancestral y la nueva población, y las poblaciones pueden divergir como consecuencia de deriva, de adaptación a diferentes ambientes o por ambos motivos.

Si el dentista pasó su infección por el VIH a sus pacientes, entonces las cepas víricas aisladas de esos pacientes deberían estar más íntimamente relacionadas entre sí y con la cepa del dentista que con cepas de cualquier otro individuo que viviera en la misma zona. Siguiendo esta línea de razonamiento, Chin-Yih Ou y colegas secuenciaron partes del gen de la proteína de cubierta del VIH de virus recogidos del dentista, 10 de sus pacientes y de otros individuos de la zona infectados con el VIH, que sirvieron como controles locales.

En la Figura 26.21 se presenta un árbol evolutivo de las cepas del VIH confeccionado con estas secuencias. Los virus aislados de los participantes del estudio están en las puntas de las ramas. Los puntos de ramificación unen estos con antece-

sores comunes deducidos. Las muestras del VIH de los pacientes A, B, C, E, G e I comparten un antecesor común más reciente y con las cepas del dentista que con cualquiera otra muestra del VIH de los otros individuos locales, Las relaciones evolutivas entre estas cepas del VIH indican que el dentista realmente transmitió su infección a dichos pacientes. Por el contrario, los virus tomados de los pacientes D, F, H y J están más relacionados con cepas de los controles locales (LC) que con las cepas del dentista. Estos pacientes se infectaron por alguien distinto del dentista. De hecho, el paciente J parece que se infectó de dos fuentes distintas. Los Centros de Control de Enfermedades, que rastrean los casos de VIH, no han sido capaces de determinar cómo tuvo lugar la transmisión del dentista a sus pacientes. No ha habido otros casos documentados de transmisión probada a pacientes en un marco de asistencia sanitaria.

Relaciones de los neandertales con los humanos actuales

Las evidencias paleontológicas indican que los neandertales, *Homo neanderthalensis*, vivieron en Europa y en el occidente asiático desde 300.000 hasta hace unos 30.000 años. Durante al menos 30.000 años, los neandertales coexistieron con humanos anatómicamente modernos (*H. sapiens*) en varias zonas. Ciertas cuestiones acerca de los neandertales y de los humanos modernos no se han resuelto: (1) ¿Se pueden considerar a los neandertales como antecesores directos de los humanos modernos? (2) ¿Se cruzaron los neandertales y el *H. sapiens*, de tal manera que todavía viven descendientes de los neandertales? ¿O murieron todos los neandertales, extinguiéndose?

Para resolver estos temas, varios grupos han centrado su atención en recuperar y analizar DNA extraído de huesos de neandertales. En 1997, Svante Pääbo, Matthias Krings y sus colegas extrajeron fragmentos de DNA mitocondrial de un esqueleto neandertal encontrado en la cueva Feldhofer, cerca de Dusseldorf, Alemania. Después de confirmar que realmente habían aislado fragmentos de genes de neandertales, los investigadores situaron las secuencias de los neandertales en un árbol filogenético junto con secuencias de más de 200 humanos moderno [Figura 26.22(a)]. De acuerdo con el análisis de Pääbo y Krings, parece que los neandertales son parientes distantes de los humanos modernos. Utilizando un reloj molecular calibrado con chimpancés y humanos, los investigadores calcularon que el último antecesor común de los neandertales y de los humanos modernos vivió hace unos 600.000 años, cuatro veces más que el último antecesor común a todos los humanos. Sin embargo, se necesita especial precaución para sacar conclusiones basadas en un único espécimen Neandertal.

Más recientemente, Igor Ovchinnikov y sus colegas analizaron DNA mitocondrial recuperado de restos Neandertales descubiertos en la cueva Mezmaiskaya, en la cordillera del Caucaso, al este del Mar Negro. Aunque las dos secuencias de neandertales (es decir, la de Pääbo y Krings por un lado y la de Ovchinnikov por otro) son de individuos de diferentes regiones geográficas, separadas más de 1.600 kilómetros, varían solo en un 3,5 por ciento, indicando que derivan de un único conjunto de genes. Además, la cantidad de variación entre las dos secuencias de neandertales es comparable a la que se observa entre humanos modernos. Los análisis filogenéticos sitúan a lo dos neandertales en un grupo distinto de los humanos modernos [Figura 26.22(b)]; la conclusión que se puede deducir de estos dos estudios es que, aunque los neandertales y los humanos tienen un antecesor común, los neandertales fueron una línea separada de homínidos y no contribuyeron con genes mitocondriales al *H. sapiens*. En conjunto, los estudios sugieren que cuando los neandertales desaparecieron, su linaje se extinguió con ellos.

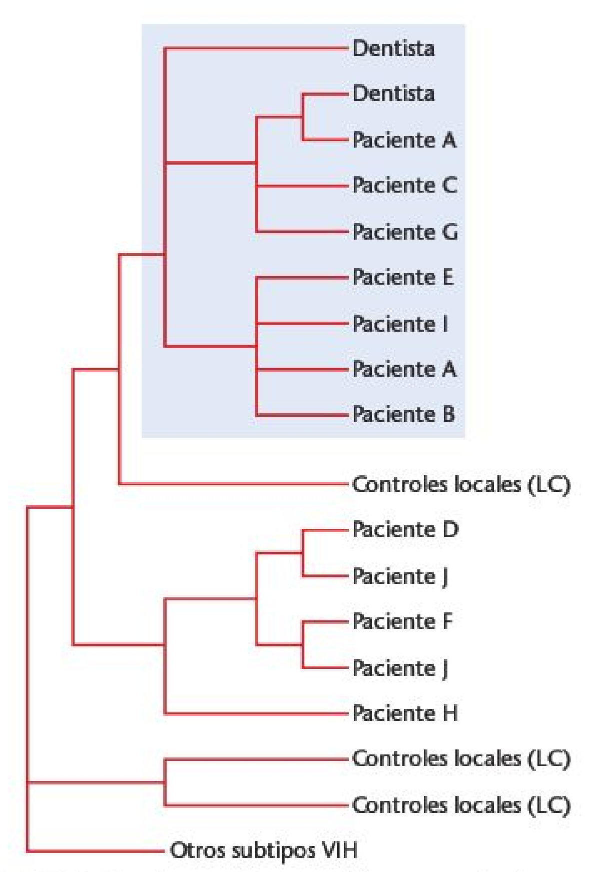


FIGURA 26.21 Filogenia de cepas del VIH tomadas de un dentista y de sus pacientes, y varios controles locales (LC). El grupo de cepas víricas en la parte sombreada de la filogenia derivan todas de una cepa antecesora común.

El origen de las mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos celulares que tienen su propio genoma en forma de una molécula de DNA circular. En la especie humana, el genoma mitocondrial codifica 13 proteínas necesarias para la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, 22 moléculas de tRNA y 2 genes de rDNA. La organización y función del genoma mitocondrial presenta muchas semejanzas con el genoma de las bacterias. Por consiguiente, se piensa que

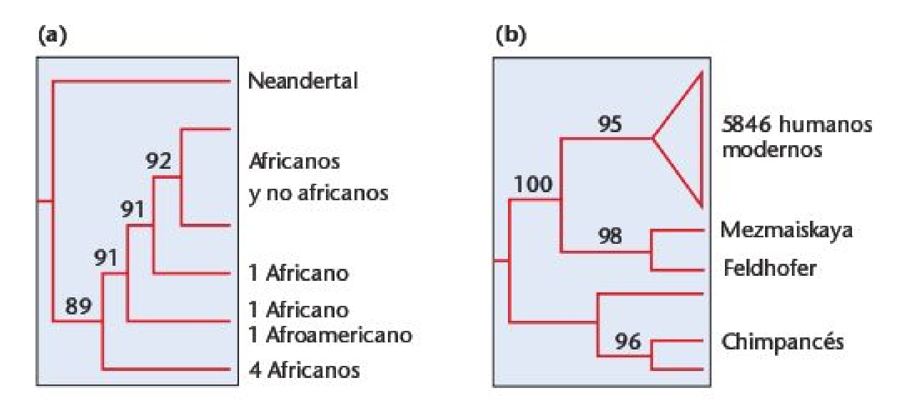


FIGURA 26.22 (a) Filogenia estimada de las secuencias del DNA mitocondrial de un neandertal y de unos 2.000 humanos modernos. *(a) Según Krings, M. et al., 1997. Cell 90:19-30. Figure 7A, p. 26, copyright 1997 con el permiso de Elsevier; (b) Según Ovchinnikov, I.V. et al., Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. Nature 404: 490-93. Copyright 2000 Macmillan Publishers Ltd.*

las mitocondrias derivan de bacterias; es decir, son descendientes de organismos procariotas de vida libre que se convirtieron en simbiontes intracelulares de células huéspedes nucleadas. Una vez incorporadas en una célula nucleada, el genoma de las mitocondrias se hizo más pequeño con el tiempo, y el reducido genoma que vemos ahora en las mitocondrias se cree que es la consecuencia de pérdida de genes y transferencia de genes al núcleo de la célula huésped. Sin embargo, quedan muchas preguntas acerca del origen y evolución de las mitocondrias. Una de ellas se refiere al origen bacteriano de las mitocondrias: ¿De qué grupo de bacterias descienden?

Los investigadores han utilizado información derivada de la secuencia de nucleótidos de genes mitocondriales para el RNA de la subunidad pequeña del ribosoma (SSU rRNA). Estas secuencias tienen fuertes constricciones funcionales y están muy conservadas. El análisis filogenético de las secuencias identifica a un grupo de bacterias conocido como las α-proteobacterias (bacterias púrpura) como los parientes vivos más próximos de las mitocondrias. Un trabajo más reciente ha dividido a este grupo en dos subclases, una de las cuales se llama la subdivisión riquetsial.

Basándose en la filogenia de la SSU, las riquetsias se han identificado como las bacterias más íntimamente relacionadas con las mitocondrias. Es interesante que las riquetsias, como las mitocondrias, solo vivan dentro de células eucariotas.

Sin embargo, a diferencia de las mitocondrias, las riquetsias son parásitos que provocan enfermedad, responsables del tifus, una de las enfermedades más graves en la historia de nuestra especie. La secuenciación del genoma de una especie de riquetsia, *Rickettsia prowazekii*, proporciona nuevas ideas acerca de las relaciones entre estas bacterias y las mitocondrias. Utilizando la información de la secuencia del genoma de genes implicados en la síntesis de ATP derivados de *R. prowazekii*, otras bacterias y mitocondrias de varios orígenes, Siv Andersson y colegas construyeron un árbol filogenético (Figura 26.23). Su árbol indica una íntima relación evolutiva entre *R. prowazekii* y las mitocondrias. Las evidencias del análisis de la SSU da lugar a un árbol similar. Así, dos líneas de evidencia, de la SSU y de las proteínas implicadas en la síntesis de ATP, proporcionan una clara evidencia de que las mitocondrias que llevamos en nuestras células derivan de un antiguo antecesor de las riquetsias.

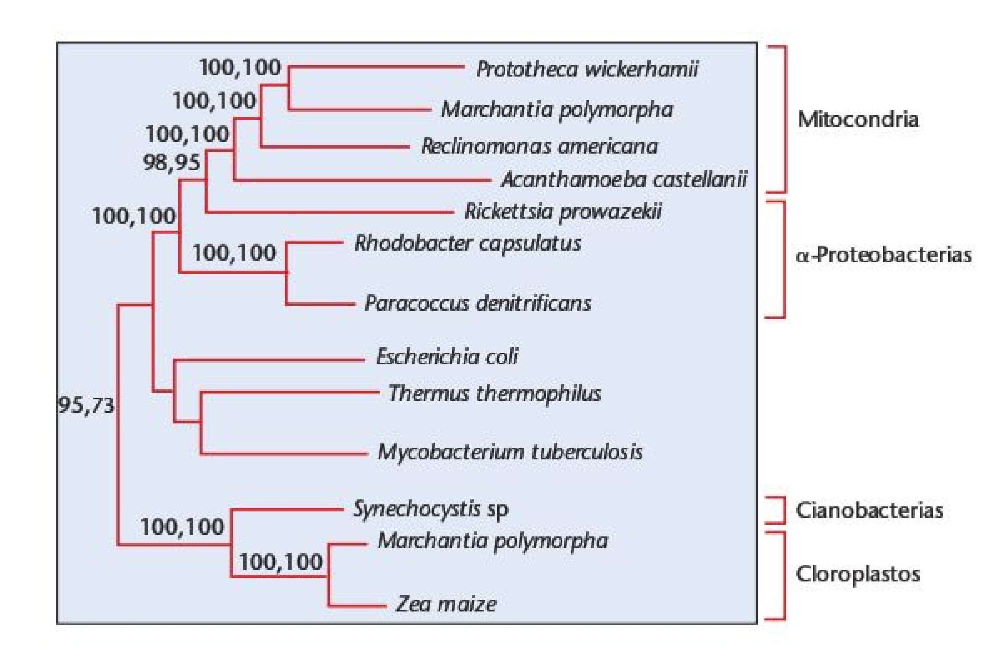
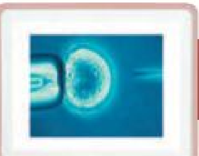


FIGURA 26.23 Relaciones evolutivas de las mitocondrias, α-proteobacterias, cianobacterias y cloroplastos. Advierta que, aunque *R. prowazekii* es una α-proteobacteria está más íntimamente relacionada con las mitocondrias que con las otras α-proteobacterias. *Según Andersson, S.G.E. et al., The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origino of mitochondria. Nature 396:133-43, copyright 1998 Macmillan Publishers Ltd.*



Genética, tecnología y sociedad

¿Qué podemos aprender del fracaso del movimiento eugenésico?

El movimiento eugenésico tuvo sus orígenes en las ideas del científico inglés Francis Galton, convencido por sus estudios de la aparición de genios en familias (incluida la suya propia) y de que la inteligencia era heredable. Galton concluyó en su libro *Hereditary genius* (1869) que seria «muy posible producir una raza de hombres con talento mediante juiciosos matrimonios durante varias generaciones consecutivas». El término eugenesia, acuñado por Galton en 1883, se refiere a la mejora de la raza humana mediante tales matrimonios selectivos. Una vez que se redescubrieron los principios de Mendel en 1900, el movimiento eugenésico floreció.

Los partidarios de la eugenesia creían que una amplia variedad de atributos humanos se heredaban como caracteres mendelianos, incluidos muchos aspectos del comportamiento, de la inteligencia y del talante moral. Su idea dominante fue que en la población se estaban reproduciendo más rápidamente los individuos genéticamente «débiles mentales» e inmorales que los genéticamente superiores y que este diferencial en la tasa de nacimientos daría lugar a un deterioro progresivo de la capacidad intelectual y de la fibra moral de la raza humana. Se propusieron varios remedios. La eugenesia positiva animaba a los padres especialmente «aptos» a tener más hijos. Sin embargo, el punto más importante de los objetivos de los eugenista fue el planteamiento eugenésico negativo, dirigido a desaconsejar la reproducción en individuos genéticamente inferiores, o mejor todavía, a impedir que se reprodujeran.

En los Estados Unidos, el movimiento eugenésico gozó de amplio apoyo popular durante un tiempo y tuvo un impacto significativo en la política. Parcialmente por la insistencia de prominentes eugenistas, 30 estados aprobaron leyes que forzaban la esterilización de criminales, epilépticos y recluidos en instituciones mentales; la mayoría de los estados decretaron leyes que invalidaban los matrimonios entre «débiles mentales» y entre otros considerados inadecuados eugenésicamente. Sin embargo, la cima de los logros legislativos del movimiento eugenésico fue el trámite y aprobación de Immigration Restriction Act (Ley de restricción de la inmigración) de 1924, que limitaba rigurosamente la entrada de inmigrantes del este y del sudeste de Europa debido a su reconocida inferioridad mental.

A lo largo de las dos primeras décadas del siglo xx, muchos genéticos aceptaron pasivamente los puntos de vista de los eugenistas, pero hacia 1930, las críticas reconocían que los objetivos del movimiento eugenésico estaban determinados más por racismo, prejuicios de clase y sentimientos anti-inmigratorios que por razones genéticas. Cada vez más, prominentes genéticos comenzaron a hablar en contra del movimiento eugenésico, entre los que destacaron William Castle, Thomas Hunt Morgan y Hermann Muller. Cuando se comenzó a conocer los horrorosos extremos a los que habían llegado los Nazis apoyándose en la eugenesia, surgió una fuerte reacción que terminó con el movimiento eugenésico.

Paradójicamente, el movimiento eugenésico surgió al mismo tiempo que se estaban desarrollando los principios mendelianos, principios que finalmente socavaron los fundamentos teóricos de la eugenesia. En la actualidad, cualquier estudiante que ha completado un curso de genética general debería ser capaz de identificar los diferentes errores básicos que tuvieron los eugenistas.

1. Suponían que los caracteres humanos complejos, como la inteligencia y la personalidad, eran estrictamente hereditarios, descartando completamente cualquier contribución ambiental al fenotipo. Su razonamiento fue que si ciertos caracteres se dan en familias, debían estar determinados genéticamente.
2. Suponían que estos caracteres estaban determinados por genes individuales, con alelos dominantes y recesivos. Esta creencia persistió a pesar de que la investigación demostraba que múltiples genes contribuían a muchos fenotipos.
3. Suponían que en la especie humana existía un único genotipo ideal. Probablemente, tal genotipo sería muy homozigoto a fin de mantenerse. Este concepto era contrario a la evidencia en boga que sugería que un alto nivel de homozigosis es a menudo deletéreo, lo que apoyaba la superioridad del heterozigoto.
4. Suponían que la frecuencia de los defectos de herencia recesiva de la población podían reducirse significativamente, evitando que los homozigotos se reprodujeran. De hecho, para los caracteres recesivos que son relativamente raros, la mayoría de los alelos recesivos de la población se encuentran en heterozigotos sanos que escapan a la selección. Las prácticas de eugenesia negativa, independientemente de cuan rigurosas sean, son relativamente ineficaces para eliminar tales caracteres.
5. Pensaban que aquellos que se consideraban genéticamente inadecuados podrían reproducirse más que aquellos que se pensaba eran genéticamente aptos. Esto es exactamente lo contrario del concepto de eficacia darwiniana, que equipara el éxito reproductivo con la eficacia. (Galton tendría que haber entendido esto, siendo primo hermano de Darwin!)

Han pasado más de siete décadas desde que el movimiento eugenésico tuvo su máximo esplendor. Ahora tenemos un conocimiento de la genética más preciso, así como una mayor conciencia de su potencial mal uso. Pero la aplicación de la tecnología genética actual ha hecho posible una «nueva eugenesia» con un alcance y potencia que Francis Galton no hubiera podido imaginar. En particular, el análisis genético prenatal y la fecundación *in vitro* permiten la selección de niños de acuerdo con su genotipo, un potencial que se incrementará enormemente a medida que se asocien más y más genes con enfermedades hereditarias y quizás incluso con caracteres de comportamiento.

A medida que entramos en esta nueva era de la genética, no debemos olvidar los errores cometidos por los primeros eugenistas. Debemos recordar que el fenotipo

es el resultado de una interacción compleja entre el genotipo y el ambiente y no caer en un planteamiento que trate a las personas solo como una colección de genes. Debemos recordar que muchos genes pueden contribuir a un fenotipo concreto, sea una enfermedad o un comportamiento, y que los alelos de estos genes pueden interactuar de manera impredecible. No debemos caer victimas del supuesto de que hay un genotipo ideal. El éxito de todas las poblaciones en la naturaleza se cree que está incrementada por la diversidad genética. Y por encima de todo, no debemos utilizar la información genética para conseguir objetivos ideológicos. Podemos encontrar que hay una estrecha línea entre el uso legítimo de la tecnología genética, para tener niños sanos, y las prácticas eugenésicas. Seremos nosotros los que tengamos que decidir donde está exactamente dicha línea.

Referencias

Allen, G.E., Jacoby, R., and Glauberman, N. (eds.). 1995. Eugenics and American social history, 1880–1950. *Genome* 31:885–89.

Hartl, D.L. 1988. A primer of population genetics, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Kevles, D.J. 1985. In the name of eugenics: Genetics and the uses of human heredity. Berkeley: Univ. of California Press.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

1. Las especies actuales son el producto de una historia evolutiva que incluye la transformación, separación y divergencia de linajes. Alfred Russel Wallace y Charles Darwin formularon la teoría de la selección natural, que proporciona el mecanismo principal para la transformación de los linajes. Las bases genéticas de la evolución y el papel de la selección natural para cambiar las frecuencias alélicas se descubrió en el siglo XX.
2. Cuando los genéticos de poblaciones comenzaron a estudiar la estructura genética de las poblaciones, encontraron que muchas de ellas albergan una considerable diversidad genética, que quedo clara en estudios de electroforesis de proteínas y al nivel de las secuencias del DNA. Si la diversidad genética de las poblaciones se mantiene principalmente por mutación más deriva genética o por selección natural es un asunto de cierto debate.
3. El rango geográfico de muchas especies abarca cierto grado de diversidad ambiental. Como consecuencia de la adaptación a ambientes distintos y de la deriva genética, poblaciones diferentes de una especie pueden tener alelos o frecuencias alélicas distintas en muchos loci.
4. El flujo génico entre poblaciones tiende a homogeneizar su composición genética. Cuando el flujo génico es reducido, la deriva genética y la adaptación a ambientes distintos pueden dar lugar a que las poblaciones diverjan. Finalmente, las poblaciones pueden llegar a ser tan diferentes que los individuos de una población no puedan cruzarse con individuos de otra. En este punto, las poblaciones divergentes se han convertido en especies distintas.
5. Debido a que la especiación está asociada con divergencia genética, podemos utilizar las diferencias genéticas entre especies para deducir su historia evolutiva. Comparando las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos, podemos determinar la distancia genética entre especies. Luego podemos utilizar las distancias genéticas para reconstruir árboles evolutivos. Los métodos más simples para reconstruir filogenias se basan en la suposición de que las especies menos divergentes son parientes más próximos.
6. La reconstrucción de los árboles evolutivos es una técnica clave para responder a diversas cuestiones de interés. Entre los ejemplos se incluye el seguir la ruta de la transmisión de una enfermedad epidémica, descifrar hechos recientes en la evolución humana y en determinar las relaciones evolutivas entre todos los organismos.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. El análisis de la secuencia del DNA se puede realizar mediante una serie de técnicas. Por otro lado, la secuenciación de proteínas es más compleja de realizar, debido al hecho de que hay 20 subunidades diferentes, necesarias para una identificación y enumeración sin ambigüedades en contra de los cuatro nucleótidos del DNA. Debido a sus propiedades únicas, los aminoácidos N-terminal y C-terminal de una proteína son fáciles de identificar, pero el orden interior es un reto difícil, ya que muchas proteínas contienen cientos de aminoácidos. ¿Cómo se realiza la secuenciación de las proteínas?

Solución: La estrategia para la secuenciación de las proteínas es la misma que para el DNA: divide y vencerás. Para realizar esto, se utilizan enzimas específicas que rompen a las proteínas entre ciertos aminoácidos. El uso de enzimas distintas da lugar a fragmentos solapantes, cada uno de los cuales se aíslan y se determina la secuencia de sus aminoácidos mediante métodos químicos. Las secuencias de los fragmentos solapantes se ensamblan para dar la secuencia completa de la proteína. Alternativamente, los investigadores pueden secuenciar primero al gen que codifica a la proteína y luego utilizar el código genético para deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína.

2. Súbitamente, en una población apareció una planta dos veces mayor que las otras. Normalmente las plantas de dicha especie se reproducen por autofecundación y por fecundación cruzada. Esta nueva planta gigante ¿podría ser simplemente una variante o una nueva especie? ¿Cómo se podría determinar?

Solución: Uno de los mecanismos de especiación más ampliamente extendidos en plantas superiores es la poliploidía, la multiplicación de dotaciones completas de cromosomas. El resultado de la poliploidía es, normalmente, una planta más grande, con flores y semillas más grandes. Hay dos maneras de comprobar la nueva variante para determinar si es una especie nueva. Primero, se tendría que cruzar la planta gigante con una planta de tamaño normal para ver si produce descendencia viable y fértil. Si no lo hace, entonces los dos tipos de plantas estarían reproductivamente aislados. Segundo, se debería analizar citogenéticamente la planta gigante para examinar sus complementos cromosómicos. Si tiene doble número que su vecino de tamaño normal, sería un tetraploide que pudo haber surgido espontáneamente. Si el número de cromosomas difiere por un factor de dos y la nueva planta esta aislada reproductivamente de sus vecinos normales, es una nueva especie.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. ¿Cuál la definición de evolución para los Neo-darwinistas?

2. Defina la especiación. ¿Cómo difiere de la evolución?

3. Wallace y Darwin identificaron la selección natural como una fuerza que actúa sobre la variación fenotípica. ¿Qué dos procesos relacionados con la variación fenotípica no pudieron explicar?

4. Dos especies íntimamente emparentadas pueden tener muy pocas diferencias fenotípicas. ¿Cómo podemos justificar su clasificación como especies distintas en lugar de cómo una especie con un pequeño rango de variación fenotípica?

5. La selección natural puede dar lugar a especiación. ¿Es la única manera de que se formen especies?

6. El mantenimiento de la diversidad alozímica en poblaciones naturales es un tema controvertido. Nevo (2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 98:6233-40) examinó los polimorfismos de 111 especies de mamíferos no subterráneos y 132 subterráneos y encontró que los mamíferos subterráneos son menos polimórficos que los que no lo son. Proporcione una explicación posible.

7. Discuta la lógica de que las inversiones en el cromosoma 3 de *D. pseudoobscura* representan variación genética.

8. Los estudios de Dobzhansky en poblaciones de *D. pseudoobscura* demostraron cambios en las frecuencias de las ordenaciones cromosómicas ST y CH a lo largo del año. ¿Por qué no se eliminó una de estas ordenaciones en un largo periodo de tiempo?

9. Describa como se pueden formar poblaciones con diferencias genéticas sustanciales. ¿Cuál es el papel de la selección natural?

10. Price *et al.* (1999, *J. Bacteriol.* 181:2358-62) realizaron un estudio genético de la proteína de transporte de toxina (PA) de *Bacillus anthracis*, la bacteria del ántrax en humanos. Dentro del gen de 2294 nucleótidos, identificaron 5 mutaciones puntuales —2 con cambio de sentido y 3 sinónimas— en diferentes aislados de 26 cepas. Muestras de necropsias de un brote de ántrax en 1979 reveló una nueva mutación de cambio de sentido y 5 cambios de nucleótidos únicos entre 10 víctimas. Los autores concluyeron que estos datos indicaban poca o ninguna transferencia horizontal entre diferentes cepas de *B. anthracis*. (a) ¿Qué tipo de cambios de nucleótidos (con cambio de sentido o sinónimos) da lugar a cambios en los aminoácidos? (b) ¿Qué significa transferencia horizontal? (c) ¿Sobre que base concluyeron los autores que no había evidencias de transferencia horizontal en sus datos?

11. ¿Qué tipos de sustituciones nucleotídicas no se detectarán en estudios electroforéticos del producto proteico de un gen?

12. Un estudio reciente examinando las tasas de mutación de 5.669 genes de mamíferos (17.208 secuencias) indica que, en contra de la creencia popular, las tasas de mutación entre linajes con enormes diferencias en la duración de la generación y en atributos fisiológicos, son notablemente constantes (Kumar, S., and Subramanian, S. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.[USA]* 99:803-08. La tasa promedio se estima en $12{,}2 \times 10^{-9}$ por pb por año. ¿Cuál es el significado de este descubrimiento en relación con la evolución de los mamíferos?

13. Discuta los argumentos que apoyan la teoría neutralista de la evolución molecular. ¿Qué argumentos en contra proponen los seleccionistas? ¿qué utilidad tiene el debate sobre la teoría neutralista?

14. ¿Qué cambios genéticos tienen lugar durante la especiación?

15. El mummichog presenta para el *Ldh* frecuencias alélicas diferentes en aguas frías del norte y en cálidas del sur. (a) ¿Hay correlación entre el tipo de alelo, la frecuencia alélica y la temperatura del agua? (b) ¿Por qué hay diferencias en eficacia catalítica y diferencias importantes en las tasas de transcripción en esta estrategia adaptativa?

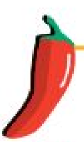
16. Haga una lista de las barreras que evitan el intercambio de genes entre poblaciones y dé un ejemplo de cada.

17. ¿Cuáles son los dos tipos de mecanismos de aislamiento reproductivo? ¿Cuál de estos se considera más eficaz y por qué?

18. En la planta del tabaco *N. tabacum*, formada como híbrido entre *N. otophora* y *N. silvestris*, ¿esperaría encontrar niveles más altos de heterozigosis en especies poliploides que en las especies diploides paternas? ¿Es esto una ventaja o un invonveniente?

19. ¿Por qué hay muchas especies de fanerógamas poliploides, pero sólo unas pocas especies de animales?

20. Algunos críticos han advertido que el uso de la terapia génica para corregir trastornos genéticos afectará el curso de la evolución humana. Evalúe esta crítica a la luz de lo que conoce sobre la genética de poblaciones y evolución, distinguiendo entre terapia génica somática y de la línea germinal.



Problemas extra-picantes

21. A continuación se muestran dos secuencias homólogas de las cadenas α y β de la hemoglobina humana. Consulte el diccionario del código genético (Figura 13.7) y determine cuántas sustituciones de aminoácidos han ocurrido como consecuencia de una sola sustitución nucleotídica. Para aquellas que no pueden darse como consecuencia de un solo cambio, determina la distancia mutacional mínima.

α:	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro
β:	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys

22. Determine la distancia mutacional mínima entre estas secuencias de aminoácidos del citocromo c de diversos organismos. Compare las distancias entre humanos y cada organismo.

Humanos:	Lys	Glu	Glu	Arg	Ala	Asp
Caballos:	Lys	Thr	Glu	Arg	Glu	Asp
Cerdos:	Lys	Gly	Glu	Arg	Glu	Asp
Perros:	Thr	Gly	Glu	Arg	Glu	Asp
Gallinas:	Lys	Ser	Glu	Arg	Val	Asp
Ranas:	Lys	Gly	Glu	Arg	Glu	Asp
Hongos:	Ala	Lys	Asp	Arg	Asn	Asp

23. A continuación se presentan datos de secuencias cortas de DNA de cinco especies: Humana, chimpancé, gorila, orangután y babuino. Cada secuencia tiene 50 pb. Representan un tramo corto de un gen que especifica la proteína testicular Y, localizado en el cromosoma Y. Se da la secuencia humana completa; la secuencia de las otras cuatro especies se muestra sólo en donde difieren de la humana. Calcule la diferencia genética entre cada par de especies. (Por ejemplo, chimpancés y gorilas difieren en 2 de las 50 bases, o el 4 por ciento; por ello, la diferencia genética entre chimpancés y gorilas es de 0,04.) Luego utilice el UPGMA para reconstruir la filogenia de estas cinco especies. ¿Está de acuerdo su filogenia con la que se muestra en la Figura 26.19?

24. Las diferencias genéticas entre las dos especies de *Drosophila*, *D. heteroneura* y *D. silvestris*, medida por la diversidad de nucleótidos, es alrededor del 1,8 por ciento. Las diferencias entre los chimpancés (*P. troglodytes*) y los humanos (*H. sapiens*) es aproximadamente la misma, aunque la última especie se clasifica en género distinto. En su opinión, ¿es esto válido? Explique porqué.

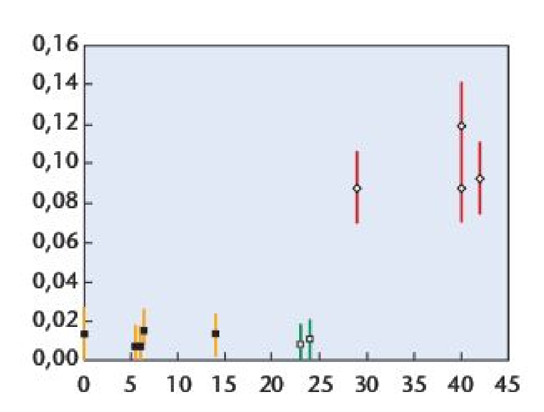
25. La utilización de los datos de las secuencias de nucleótidos para medir la variabilidad genética es complicada por el hecho de que los genes de los eucariotas superiores son complejos en organización y tienen regiones flanqueantes 5′ y 3′ así como intrones. Los investigadores han comparado la secuencia de nucleótidos de dos alelos clonados del gen de la γ-globina de un solo individuo y encuentran una variación del 1 por ciento. Estas diferencias incluyen 13 sustituciones de un nucleótido por otro y 3 segmentos cortos de DNA que se han insertado en un alelo o delecionado en el otro. Ninguno de los cambios tiene lugar en los exones del gen (regiones codificantes). ¿Por qué cree que esto es así, y podría cambiar nuestro concepto de la variación genética?

26. En un estudio reciente sobre los cíclidos que habitan el Lago Victoria de África, Nagl et al. (1998. *Proc. Natl. Acad. Sci.[USA]* 95:14.238-43) examinaron polimorfismo de secuencias que se sospechaban neutras en loci genómicos no codificantes de 12 especies del lago y de sus posibles antecesores ribereños. En todos los loci se encontró el mismo polimorfismo en casi todas las especies comprobados del lago Victoria, tanto lacustres como ribereñas. Se encontraron diferentes polimorfismos en estos loci en cíclidos de otros lagos africanos. (a) ¿Por qué se sospecharía de la localización de secuencias neutras en regiones genómicas no codificantes? (b) ¿Qué conclusiones se pueden deducir de estos polimorfismos en términos de la antigüedad de los cíclidos en estos lagos?

27. Dado que hay aproximadamente 400 especies de cíclidos en el lago Victoria y que se secó casi completamente hace unos 14.000 años, ¿qué evidencias indican que ocurrió una extremadamente rápida adaptación evolutiva en lugar de una amplia inmigración?

```
Humano:     AGAGGTTTTTCAGTGAATGAAGCTATTTTTAAGGGAGTGTGATTGCTGCC
Chimpancé:                    C
Gorila:                T      C                            C
Orangután:   T        GT   C  C                 C          C
Babuino:     C C  G  G T      C        G       GC      C   C G
```

28. La comparación del DNA mitocondrial de neandertales con el de los humanos modernos indica que no están relacionados y que no contribuyeron a nuestra herencia mitocondrial. Sin embargo, ya que los neandertales y los humanos modernos se separaron hace al menos 25.000 años, esto no excluye alguna forma de cruce que diera lugar a que el conjunto de genes de los europeos modernos derivara tanto de neandertales como de humanos primitivos (los cromañones). Para resolver esta cuestión, Caramelli et al. (2003. *Proc. Natl. Acad. Scie [USA]* 100:6593-97) analizaron secuencias de DNA mitocondrial de restos de cromañones y las



compararon con cuatro especimenes neandertales y una gran serie de datos de humanos modernos. Los resultados se muestran en el gráfico de la derecha. El eje de las x indica la edad de los especimenes en miles de años: el eje de las y indican la distancia genética promedio. Los humanos modernos están indicados por cuadrados negros; los cromañones por cuadrados vacíos y los neandertales por rombos. (a) ¿Qué se puede concluir sobre las relaciones entre los cromañones y los europeos modernos? ¿Y qué acerca de las relaciones entre los cromañones y los neandertales? (b) De estos datos, ¿parece probable que los neandertales hayan contribuido algo al conjunto de genes de los cromañones y de los europeos modernos?

LECTURAS SELECCIONADAS

Adcock, G.J., Dennis, E.S., Easteal, S., Huttley, G.A., Jermiin, L.S., Peacock, W.J., and Thorne, A. 2001. Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98:537-42.

Anderson, W., Dobzhansky, T., Pavlovsky, O., Powell, J., and Yardley, D. 1975. Genetics of natural populations: XLII. Three decades of genetic change in *Drosophila pseudoobscura. Evolution* 29:24-36.

Ayala, F.J., 1984. Molecular polymorphism: How much is there, and why is there so much? *Dev. Genet.* 4:379-91.

Bradshaw, H.D., Jr., Otto, K.G., and Frewen, B.E. 1998. Quantitative trait loci affecting differences in floral morphology between two species of monkey flower (*Mimulus*). *Genetics* 149:367-82.

Dobzhansky, T. 1947. Adaptive changes induced by natural selection in wild populations of *Drosophila. Evolution* 1:1-16.

Freeman, S., and Herron, J.C. 2001. *Evolutionary analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Gould, S.J. 1982. Darwinism and the expansion of evolutionary theory. *Science* 216:380-87.

Hardison, R. 1999. The evolution of hemoglobin. *Amer. Scient.* 87:126-37.

Ke, Y., et al. 2001. African origin of modern humans in East Asia: A tale of 12,000 Y chromosomes. *Science* 292:1151-53.

Kimura, M. 1989. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome* 31:24-31.

King, M.C., and Wilson, A.C. 1975. Evolution at two levels: Molecular similarities and biological differences between humans and chimpanzees. *Science* 188:107-16.

Knowlton, N., Weigt, L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., and Bermingham, E. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260:1629-32.

Kramer, E.M., and Irish, V.F. 1999. Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* 399:144-48.

Kreitman, M. 1983. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 304:412-17.

Lamb, R.S., and Irish, V.F. 2003. Functional divergence within the APETALA3/PISTILLATA floral homeotic gene lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:6558-63.

Lewontin, R.C., and Hubby, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations: II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura. Genetics* 54:595-609.

Ou, C.-Y., et al. 1992. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* 256:1165-71.

Powers, D.A., and Schulte, P.M. 1998. Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment: A multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish. *J. Exper. Zool.* 282:71-94.

Relethford, J.H. 2001. Ancient DNA and the origin of modern humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98:390-91.

Stiassny, M.L.J., and Meyer, A. 1999. Cichlids of the Rift Lakes. *Sci. Am.* (Feb.) 280:64-69.

Takahashi, K., 1998. A novel family of short interspersed repetitive elements (SINES) from cichlids: The pattern of insertion of SINES at orthologous loci support the proposed monophyly of four major groups of cichlid fishes in Lake Tanganyika. *Mol. Biol. Evol.* 15:391-407.

Genética de la conservación

CAPÍTULO VEINTISIETE



Semillas conservadas criogénicamente de variedades raras de plantas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Laboratorio Nacional de Almacenamiento de Semillas.

CONCEPTOS DEL CAPÍTULO

- Las especies necesitan diversidad genética para adaptarse y sobrevivir largo tiempo.
- Las poblaciones pequeñas y aisladas son particularmente vulnerables a efectos genéticos.
- Las poblaciones en peligro de extinción que se recuperan en tamaño pueden no redesarrollar diversidad genética.
- La conservación y los esfuerzos de cría se centran en retener la diversidad genética para la supervivencia de las especies a largo plazo.

A medida que progrese el siglo XXI, la diversidad de la vida sobre la Tierra se encontrara bajo mayor presión por lo efectos directos o indirectos del explosivo crecimiento de las poblaciones humanas. Hace unos 10.000 años vivían sobre el planeta aproximadamente 10 millones de *Homo sapiens*. Este número creció hasta 100 millones hace 2.000 años y a 2.500 millones en 1950. Durante la duración de una sola generación, la población humana mundial se ha más que doblado hasta 5.500 millones en 1993 y se prevé alcanzar 19.000 millones hacia 2100 (Figura 27.1).

El efecto del acelerado crecimiento de las poblaciones humanas sobre otras especies ha sido marcado. Datos de la World Conservation Union (IUCN) muestra que, globalmente, el 25 por ciento de todas las especies de mamíferos, el 11 por ciento de las aves, el 20 por ciento de los reptiles, el 25 por ciento de los anfibios y el 34 por ciento de los peces son especie vulnerables o en riesgo de extinción. La situación para los vegetales no es mejor. Basándonos en las encuestas de la IUCN, el 12 por ciento de todas especies de plantas vasculares del mundo —unas 34.000 especies— están amenazadas. No solo las especies silvestres están en riesgo. La diversidad genética de las plantas cultivadas y de los animales también se está perdiendo y están desapareciendo muchas variedades cultivadas tradicionales y razas de ganado. La Food and Agricultural Organization (FAO) estima que, desde 1900, se ha perdido el 75 por ciento de la diversidad genética de las plantas cultivadas. De las cerca de 5000 razas diferentes de animales domésticos de granja en todo el mundo, un tercio están en riesgo de perderse.

¿Por qué tendríamos que estar interesados por la pérdida de biodiversidad, es decir, de la variación biológica representada por los diferentes vegetales y animales? Como el registro fósil muestra, sin relación con la influencia humana, muchas plantas y animales distintos que una vez habitaron el planeta se han extinguido hace millones de años y han sido sustituidos por otros. Sin embargo, los biólogos están interesados en el acelerado ritmo de extinción de especies de la que somos testigos actualmente, todas ellas se pueden adscribir a un impacto directo o indirecto de la especie humana. La caza o la cosecha de animales o vegetales por los humanos, la destrucción del hábitat por las actividad humana y los efectos indirectos sobre el cambio climático global esta haciendo cada vez más difícil la supervivencia de muchas especies.

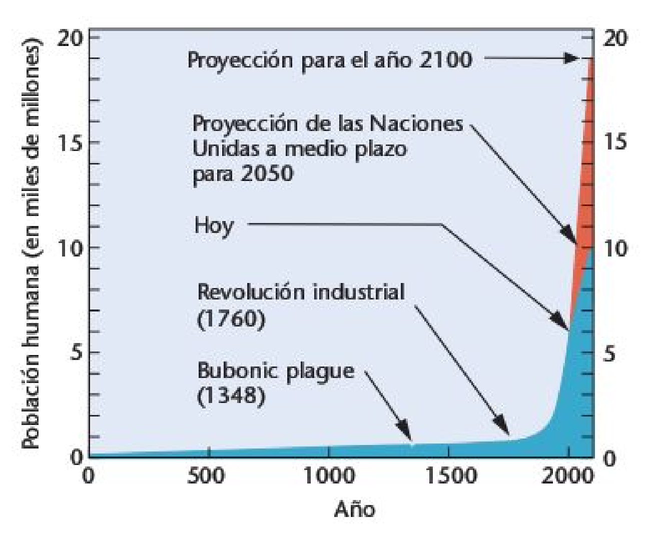


FIGURA 27.1 Crecimiento de la población humana en los pasados 2.000 años y proyección hasta 2.100.

Algunos biólogos temen que los ecosistemas —las complejas redes de interdependencia, con diversidad de vegetales y animales que se encuentran juntos en el mismo ambiente— pueden colapsarse si se pierden especies clave que los sostienen. Esto pronostica posibles consecuencias para nuestra supervivencia a largo plazo. Otros científicos han señalado que podemos perder un potencial económico desconocido u otros beneficios de vegetales y animales no explotados si permitimos que se extingan. Un ejemplo reciente, que ha recibido mucha publicidad, es el del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), un árbol escaso que se encuentra en los bosques costeros del oeste de los Estados Unidos. Esta especie, de crecimiento lento, fue ignorada por su pequeño tamaño y por la poca calidad de su madera y frecuentemente se destruyó durante operaciones de tala como un «árbol basura». En 1991 se encontró que era una fuente de taxol, un compuesto utilizado ahora ampliamente como medicamento poderoso para tratar el cáncer. A parte de los beneficios prácticos, los científicos y los no científicos han hecho suyo el hecho de que la vida humana se rebajara tanto espiritual como estéticamente si no se esfuerza en mantener la fascinante y a menudo hermosa variedad de organismos vivos con los que comparten el planeta.

¿Cómo lo sabemos?

En este capítulo nos centraremos en el planteamiento genético utilizado en los esfuerzos conservacionistas. Los genéticos de la conservación aprecian la diversidad genética y trabajan para mantener el tamaño de las poblaciones para la supervivencia de las especies a largo plazo. Cuando estudie este tema, debería intentar responder a varias cuestiones fundamentales:

- ¿Cómo determinamos el nivel de diversidad genética de una especie?
- ¿Cómo sabemos que la disminución de la diversidad genética es perjudicial para la supervivencia de las especies?
- ¿Cómo determinamos el método más efectivo para responder a la disminución del tamaño poblacional?
- ¿Cómo intentamos «conservar» la diversidad genética existente?

Los biólogos de la conservación trabajan para entender y mantener la biodiversidad, estudiando los factores que dan lugar al declive de las especies y la manera de preservarlas. El

nuevo campo de la **genética de la conservación** ha surgido en los últimos 20 años cuando los científicos han comenzado a reconocer que la genética será una herramienta importante para mantener y restaurar la viabilidad de las poblaciones. Las aplicaciones de la genética a la biología de la conservación son múltiples: En este capítulo exploraremos algunas de ellas. Subyacente al cada vez más importante papel de la genética en la biología de la conservación está el reconocimiento de que la biodiversidad depende de la diversidad genética y de que es improbable el mantenimiento de la biodiversidad a largo plazo si se pierde la diversidad genética.

27.1 La diversidad genética está en el centro de la genética de la conservación

Mientras que la biodiversidad abarca la variación representada por todas las especies animales y vegetales existentes en este planeta en un momento dado, la **diversidad genética** no es fácil de definir y estudiar. La diversidad genética se puede considerar en dos niveles: **diversidad interespecífica** y **diversidad intraespecífica**.

La diversidad entre especies, o *diversidad interespecífica*, se refleja en el número de especies vegetales y animales diferentes presentes en un ecosistema. Algunos ecosistemas tienen un alto nivel de diversidad de especies, como los bosques lluviosos tropicales en los que se pueden encontrar cientos de especies animales y vegetales diferentes en unos pocos metros cuadrados [Figura 27.2(a)]. Otros ecosistemas, especialmente en donde los vegetales y animales tienen que adaptarse en ambientes pobres, puede haber niveles inferiores de diversidad interespecífica [Figura 27.2(b)]. Las listas de especies animales y vegetales diferentes que se encuentran en un ambiente dado se

(a)



(b)



FIGURA 27.2 (a) El bosque tropical lluvioso es un ecosistema con elevada diversidad interespecífica. (b) Ciénagas costeras en Carolina del Norte, ejemplo de un ecosistema con baja diversidad interespecífica.

utilizan para recopilar inventarios de especies. Los inventarios identifican los puntos calientes de diversidad: áreas geográficas especialmente con elevados niveles de diversidad interespecífica, en donde se pueden concentrar los esfuerzos conservacionistas. Los biólogos de la conservación, que trabajan al nivel del ecosistema, están interesados en evitar que las especies se pierdan y en restaurar las especies que una vez formaron parte del sistema, pero que ya no se encuentran. La introducción del lobo gris (*Canis lupus*) en el Parque Nacional de Yellowstone y la suelta de cóndores (*Gymnogyps californianus*) criados en cautividad en California, en áreas montañosas que previamente ocuparon en el sudoeste de los Estados Unidos, son ejemplos de intentos actuales por los biólogos de la conservación para restaurar especies perdidas a sus ecosistemas.

La *diversidad intraespecífica* —la diversidad dentro de una especie— viene reflejada por el nivel de variación genética que se da entre individuos dentro de una población o de una especie dada (*diversidad intrapoblacional*) o entre poblaciones diferentes de la misma especie (*diversidad interpoblacional*). La variación genética dentro de las poblaciones se puede medir como la frecuencia de individuos de la población que son heterozigotos para un locus dado o como el número de alelos distintos presentes en el conjunto de genes de la población. Cuando se utilizan técnicas de perfiles de DNA, se puede calcular el porcentaje de loci polimórficos —aquellos que están representados por diversas bandas en los perfiles de DNA en individuos distintos— para indicar el grado de diversidad genética de una población. En especies con fecundación cruzada, la mayoría de la diversidad genética intraespecífica se encuentra al nivel intrapoblacional.

Si las poblaciones están separadas geográficamente y no hay migración o intercambio de gametos entre ellas, se puede dar una significativa diversidad interpoblacional. Por otro lado, en especies predominantemente consanguíneas (como los vegetales que se autofecundan) tienden a tener mayores niveles de diversidad interpoblacional que intrapoblacional. Hay un número limitado de genotipos que dominan en una población dada, pero una mayor variación entre poblaciones diferentes. Comprender los sistemas de apareamiento y la distribución de la variación genética en especies en peligro de extinción es importante para su conservación, no solo para asegurar la producción continuada de descendientes sino también para determinar la mejor estrategia para mantener la diversidad intraespecífica. Por ejemplo, ¿sería más efectivo conservar unas pocas poblaciones grandes que muchas diferentes y pequeñas? Esta información se puede utilizar para guiar los esfuerzos de conservación y restauración.

Pérdida de diversidad genética

La pérdida de diversidad genética en especies no domésticas está asociada normalmente con la reducción del tamaño poblacional. Esto se puede deber a una caza o recolección excesiva. Por ejemplo, los biólogos condenan la pesca comercial excesiva hasta el colapso a principios de 1990 de las poblaciones de bacalao en alta mar en las costas de Terranova —que fueron una

vez las pesquerías más productivas del mundo. La pérdida de hábitat es también una causa importante de declive poblacional. A medida que la población humana global aumenta, se utilizan más tierras para viviendas y vías de comunicación o se utilizan en producción agrícola, reduciendo o eliminando áreas que una vez fueron habitadas por animales y vegetales silvestres. La reducción de habitats disponibles reduce las poblaciones de especies silvestres y a menudo también las aísla unas de otras como poblaciones que quedan atrapadas en bolsas de tierra sin explotar rodeada por áreas utilizadas por la agricultura, el desarrollo urbano u otros usos. Este proceso se conoce como **fragmentación de la población**. Cuando las poblaciones ya no están en contacto, se interrumpe el flujo génico por migración o intercambio de gametos y se pierde un mecanismo importante para mantener la variación genética.

En especies domésticas, la pérdida de diversidad genética no es normalmente el resultado de la pérdida de hábitat o de la reducción del tamaño poblacional; hay poco riesgo de que las vacas o el maíz se extingan como especies en un tiempo más o menos próximo. La reducción de diversidad en especies domésticas se puede atribuir a los cambios en la práctica agrícola y a las demandas de los consumidores. Las técnicas agrícolas modernas han incrementado enormemente el nivel de producción, pero también han dado lugar a una mayor uniformidad genética. Cuando los agricultores cambian a una nueva variedad de cultivo o a una cepa de ganado mejorada a gran escala, abandonan el cultivo de muchos tipos locales, que pueden desaparecer si no se hacen esfuerzos para preservarlos.

Por ejemplo, en los Estados Unidos había en 1900 más de 100 tipos diferentes de patatas. Hoy, las tres cuartas partes de la producción comercial de patatas en este país depende de nueve variedades. Un solo tipo, Russet Burbank, se cultiva en el 43 por ciento de las tierras de labor. Las variedades cultivadas o las cepas de ganado actuales pueden estar mejor adaptadas a cumplir las demandas de la producción agrícola, pero las variedades más viejas tienen a menudo genes útiles que todavía pueden jugar un papel vital en funciones de supervivencia, como la resistencia a enfermedades, al frío o a la sequía. Cuando el áfido ruso del trigo (*Diuraphis noxia*), un insecto que da lugar a graves daños en las cosechas de cereales, invadió los estados Unidos en 1986, los mejoradores encontraron finalmente genes que confieren resistencia a esta plaga —no en las variedades de trigo americanas actuales, sino en las antiguas variedades tradicionales de la antigua Unión Soviética, que afortunadamente había sido recogidas y conservadas. Se cruzaron los antiguos trigos rusos con plantas de los Estados Unidos para trasferirles los genes de resistencia, dando lugar a nuevas variedades comerciales de trigo que resisten el ataque del áfido ruso del trigo, salvando a los cultivadores de trigo de pérdidas de millones de dólares.

Identificando la diversidad genética

Durante muchos años, los genéticos de poblaciones basaban sus estimas de diversidad intraespecífica en las diferencias fenotípicas entre individuos, como diferencias en el color de las semillas o de las flores o diferencias en las pintas (Figura 27.3). El perfil del DNA es un planteamiento molecular más directo utilizado para detectar y cuantificar diferencias genéticas entre individuos extraídos de una población. Esta técnica se ha convertido en una herramienta importante para detectar y estimar variación genética inter- e intrapoblacional. El DNA nuclear, mitocondrial y cloroplástico se puede analizar para determinar los niveles de variación genética. En el Capítulo 22 ya hemos descrito aplicaciones de las técnicas del perfil de DNA, utilizando enzimas de restricción o PCR. Estas técnicas también se han utilizado con DNA de especies de interés para los biólogos conservacionistas, para examinar los niveles y la distribución de la variación genética y guiar los esfuerzos para su conservación.

En un estudio reciente, se realizó un análisis de marcadores de DNA en la única población que queda de una especie vegetal en gran peligro de extinción (*Limonium cavanillesii*) que crece en las costas del mediterráneo español. Los investigadores encontraron niveles muy bajos de diversidad, pero detectaron plantas genéticamente distintas dentro de la población de las que se pudieron recoger semillas. En otro estudio reciente, al analizar marcadores del DNA del cazamoscas de los sauces, una especie de ave migratoria en peligro de extinción que nidifica en el sudoeste de los Estados Unidos, se encontró niveles significativos de variación genética dentro de poblaciones en lugares de cría diferentes, pero poca diversidad interpoblacional. Esto indicó a los científicos que estudian el cazamoscas, que la migración de aves entre poblaciones es importante para mantener la diversidad de la especie y que los esfuerzos conservacionistas se deberían dirigir hacia la preservación de los lugares de nidificación que permite que tal migración continúe.

Otra aplicación de los marcadores del DNA en la conservación es la **huella molecular del DNA**. La utilización de técnicas del perfil del DNA en práctica forense se discutió en el

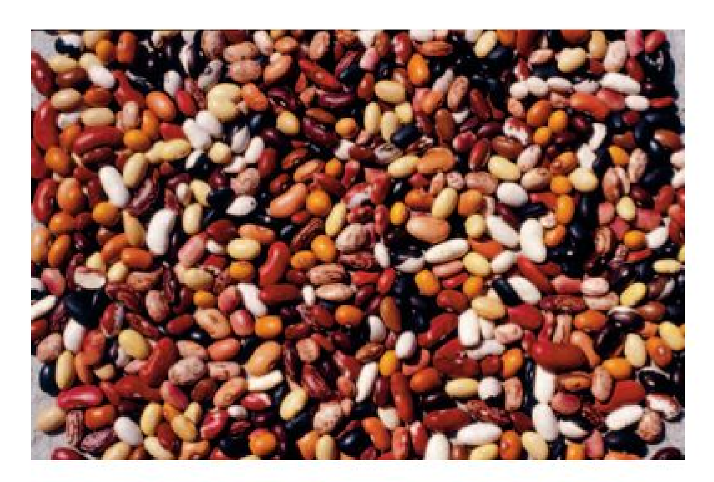


FIGURA 27.3 La variabilidad fenotípica en el color de la semilla y en las pintas en la judía común (*Phaseolus vulgaris*) revelan un alto grado de diversidad intraespecífica.

Capítulo 22; técnicas similares se pueden utilizar para descubrir comercio ilegal de especies animales y vegetales en peligro de extinción que están protegidas por la ley. Por ejemplo, desde 1986 se ha establecido una moratoria internacional sobre la pesca comercial de ballenas, con solo una caza limitada de unas pocas especies permitidas. En 1994, científicos con base en Nueva Zelanda y Hawai utilizaron el PCR para amplificar secuencias de DNA mitocondrial (mtDNA) extraído de carne vendida en mercados japoneses, en donde la carne de ballena se considera una exquisitez. La huella del DNA reveló varias muestras de carne de ballenas jorobadas y rorcuales, que son especies protegidas. Dos muestras de carne no fueron de ballena en absoluto, eran de delfín! Esta información ayudó a los oficiales de las aduanas japonesas a averiguar el origen de la carne de ballena importada ilegalmente.

En los Estados Unidos también se produce comercio ilegal de productos animales. En un estudio reciente de los científicos de la Universidad de Florida, la amplificación de secuencias de mtDNA de carne de tortuga vendida en Luisiana y Florida reveló que la cuarta parte de las muestras eran realmente de aligatores, no de tortugas. Gran parte de las restantes eran de pequeñas tortugas de agua dulce, indicando que las poblaciones de especies de tortugas de agua dulce estaban disminuyendo por el exceso de capturas y por ello necesitaban protección. Nuevas mejoras en la extracción del DNA y en las técnicas de perfil permiten ahora una identificación exacta de las especies de tortuga a partir de la carne preparada, cocinada y servida en restaurantes. Ahora disponemos de una herramienta que confiamos nos ayudará a eliminar la captura ilegal de estos reptiles amenazados.

27.2 El tamaño poblacional tiene un impacto importante en la supervivencia de las especies

Algunas especies nunca han sido numerosas, especialmente aquellas adaptadas en ambientes no usuales. Los biólogos se refieren a tales especies como *raras naturalmente*. Por otro lado, especies *raras nuevas*, son aquellas cuyos miembros han disminuido debido a presiones tales como la pérdida de hábitat. Las poblaciones de tales especies no solo pueden ser pequeñas en número sino también fragmentadas y aisladas de otras poblaciones. Tanto la disminución del tamaño poblacional como el aumento del aislamiento tienen consecuencias genéticas importantes, llevando a un mayor riesgo de pérdida de la diversidad.

¿Cuán pequeña tiene que ser una población para considerarse amenazadas? Varía algo con las especies, pero las poblaciones pequeñas pueden llegar a ser fácilmente vulnerables a fenómenos genéticos que aumenten el riesgo de extinción. En general, una población de menos de 100 individuos se considera extremadamente sensible a estos problemas, que incluyen deriva genética, consanguinidad y reducción del flujo génico. Los efectos de tales problemas en la supervivencia de las especies son sustanciales. Por ejemplo, estudios en los carneros de grandes cuernos han demostrado que poblaciones de menos de 50 individuos es muy probable que se extingan en unos 50 años. Proyecciones basadas en modelos matemáticos demuestran que, para todas las especies, poblaciones de menos de 10.000 individuos es probable que tengan limitaciones en la variación genética adaptativa y una población tiene que tener al menos unos 100.000 individuos para presentar una sostenibilidad a largo plazo.

Determinar el número de individuos que tiene que tener una población a fin de una sostenibilidad a largo plazo es complicado por el hecho de que no todos los miembros de una población tiene igual probabilidad de producir descendencia: algunos serán estériles, otros jóvenes o demasiado viejos. El *tamaño poblacional efectivo* (N_e) se define como el número de individuos de una población que tiene igual probabilidad de contribuir con gametos a la siguiente generación. N_e es casi siempre menor que el *tamaño poblacional absoluto* (N). El tamaño poblacional efectivo se puede calcular de varias maneras, dependiendo de los factores que evitan que todos los individuos de la población contribuyan lo mismo a la generación siguiente. Por ejemplo, en poblaciones con reproducción sexual con diferente número de machos y hembras, el tamaño poblacional efectivo se calcula como

$$N_e = \frac{4(N_m N_f)}{N_m + N_f}$$

en donde N_m es el número de machos y N_f el número de hembras de la población. Por ello, una población de 100 machos y 100 hembras tendría un tamaño efectivo de $4(100 \times 100)/(100 + 100) = 200$. Por el contrario, si hubiera 180 machos y solo 20 hembras, el tamaño poblacional efectivo sería $4(180 \times 20)/(180 + 20) = 72$.

El tamaño poblacional efectivo también viene influenciado por las fluctuaciones en el tamaño poblacional absoluto de una generación a la siguiente. En este caso, el tamaño poblacional efectivo es la media armónica de los números de cada generación, así

$$N_e = 1\Big/\frac{1}{t}\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \cdots + \frac{1}{N_t}\right)$$

en donde t es el número total de generaciones que se están considerando. Por ejemplo, si una población tiene una reducción temporal en su tamaño en la generación 2, de tal manera que $N_1 = 100$, $N_2 = 10$ y $N_3 = 100$, entonces

$$N_e = 1\Big/\frac{1}{3}\left(\frac{1}{100} + \frac{1}{10} + \frac{1}{100}\right) = \frac{1}{0{,}04} = 25$$

En este caso, aunque el número medio real de individuos de la población a lo largo de tres generaciones es 70, el tamaño poblacional efectivo en dicho periodo fue solo de 25. Una drástica

reducción temporal en el tamaño se le conoce como un **cuello de botella poblacional**. Los cuellos de botella ocurren cuando una población o especie se reduce a unos pocos individuos reproductores, cuyos descendientes se incrementarán luego en número en generaciones posteriores para restablecer la población. Aunque el número de individuos puede restaurarse hasta niveles más saludables, la diversidad genética de la población nuevamente expandida es a menudo fuertemente reducida debido a que los gametos del puñado de individuos que sobrevivieron y que funcionaron como padres, no representan a todas las distintas frecuencias alélicas presentes en el conjunto de genes original.



En el Problema 27.13 de la página 792 se le pide que calcule el tamaño poblacional efectivo N_e de una población de gorilas amenazados.

Sugerencia: Considere que los rasgos no usuales de la estructura social de las poblaciones de gorilas afectarán al N_e.

Programas de captura-y-cría, en los que unos pocos individuos de especies amenazadas son separados de la naturaleza y sus descendientes criados en un ambiente protegido para restaurar la población, inevitablemente dan lugar a cuellos de botella poblacionales. Los cuellos de botella también se producen de manera natural, cuando un pequeño número de individuos de una población migra para establecer una nueva población en otra parte. Cuando una nueva población derivada de un pequeño subgrupo de individuos tiene significativamente menos diversidad genética que la población original, se presenta un **efecto fundador**. Los reducidos niveles de diversidad genética debido a un efecto fundador pueden persistir durante muchas generaciones, como lo demuestran estudios en dos especies de osos marinos antárticos (*Arctocephalus gazella* y *Arctocephalus tropicalis*). Los cazadores de focas de los siglos XVIII y XIX redujeron drásticamente las poblaciones de estas especies, eliminándolas de ciertas zonas de su hábitat natural en el Océano Antártico[1]. Aunque el número de osos marinos antárticos ha aumentado y las dos especies han recolonizado gran parte de su hábitat original, la huella del mtDNA revela que todavía se detecta un efecto fundador en *A. gazella*, con variación genética reducida en las poblaciones actuales que descienden del grupo de individuos que sobrevivió.

El guepardo (*Acinonyx jubatus*), que se muestra en la Figura 27.4, es otro ejemplo bien estudiado de una especie con variación genética reducida como resultado de, al menos, un grave cuello de botella poblacional que ocurrió en su historia reciente. Las alozimas estudiadas en poblaciones de guepardos de África del Sur han mostrado niveles de variación genética que son menos del 10 por ciento de los que se encuentran en otros mamíferos. Se cree que los espermatozoides anormales y las bajas tasas reproductivas que se observan normalmente en los guepardos son el reflejo de la falta de diversidad genética, aunque todavía no está claro cómo y cuándo se produjo el cuello de botella en esta especie.



FIGURA 27.4 El guepardo (*Acinonyx jubatus*), una especie con variación genética reducida después de cuellos de botella poblacionales.

Ahora resuelva esto

En el Problema 27.22 de la página 793 se le pide que compare los datos alozímicos de las poblaciones de guepardos con datos similares de otras especies de felinos.

Sugerencia: Considere qué factores genéticos reducen potencialmente los niveles de variación genética reflejados en los datos. ¿Qué especies estarán más afectadas por dichos factores?

27.3 Los efectos genéticos son más pronunciados en poblaciones pequeñas y aisladas

Poblaciones pequeñas y aisladas, como las que se encuentran en especies amenazadas y en peligro de extinción, son especialmente vulnerables a deriva genética, consanguinidad y reducción del flujo génico. Estos fenómenos actúan sobre el conjunto de genes de forma distinta, pero finalmente tienen efectos similares en el sentido de que todos ellos pueden reducir la diversidad genética y la viabilidad de la especie a largo plazo.

[1] En el año 2000, este quinto océano mundial estaba delimitado por las partes sureñas de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico.

Deriva genética

Si el número de individuos que se aparea en una población es pequeño, la generación siguiente estará formada por pocos gametos. Los alelos que lleven estos gametos pueden no ser representativos de todos los presentes en la población; simplemente por azar, algunos alelos pueden estar poco representados o no encontrarse en absoluto, lo que dará lugar a cambios en las frecuencias alélicas con el tiempo, resultando **deriva genética**. Este fenómeno ya se ha descrito en el Capítulo 25. Una grave consecuencia de la deriva genética en las poblaciones con un tamaño poblacional efectivo pequeño es la pérdida de variación genética. La deriva genética es un proceso aleatorio, por lo que tanto alelos deletéreos como ventajosos pueden quedar fijados en una población pequeña. Esto significa que alelos útiles pueden perderse incluso si tienen el potencial de aumentar la eficacia o la adaptabilidad a largo plazo.

Consanguinidad

En poblaciones pequeñas, la probabilidad de **consanguinidad** es mayor (cruce entre individuos íntimamente emparentados). Como se describió en el Capítulo 25, la consanguinidad aumenta la proporción de homozigotos en la población, incrementando así la posibilidad de que un individuo pueda ser homozigoto para un alelo deletéreo. Ya hemos visto en el Capítulo 25 cómo se puede cuantificar el grado de consanguinidad de una población mediante el **coeficiente de consanguinidad (*F*)**, que mide la probabilidad de que dos alelos de un gen dado deriven de un alelo ancestral común. Recuerde que el coeficiente de consaguinidad está inversamente relacionado con la frecuencia de heterozigotos de la población, y se puede calcular como

$$F = \frac{2pq - H}{2pq}$$

en donde $2pq$ es la frecuencia esperada de heterozigotos basada en la ley de Hardy-Weinberg, y H es la frecuencia real de heterozigotos en la población.

En una población en declive que ha llegado a ser bastante pequeña como para que ocurra deriva, la heterozigosis (H) disminuirá en cada generación. Cuanto menor sea el tamaño poblacional efectivo, más rápidamente disminuirá H dando lugar a un aumento de F, como se puede ver en la ecuación

$$H_t/H_0 = \left(1 - 1/2N_e\right)^t$$

en donde H_0 es la frecuencia inicial de los heterozigotos, H_t es la frecuencia de los heterozigotos después de t generaciones y N_e es el tamaño poblacional efectivo. En la Figura 27.5 se comparan las tasas del incremento de F para diferentes tamaños poblacionales efectivos.

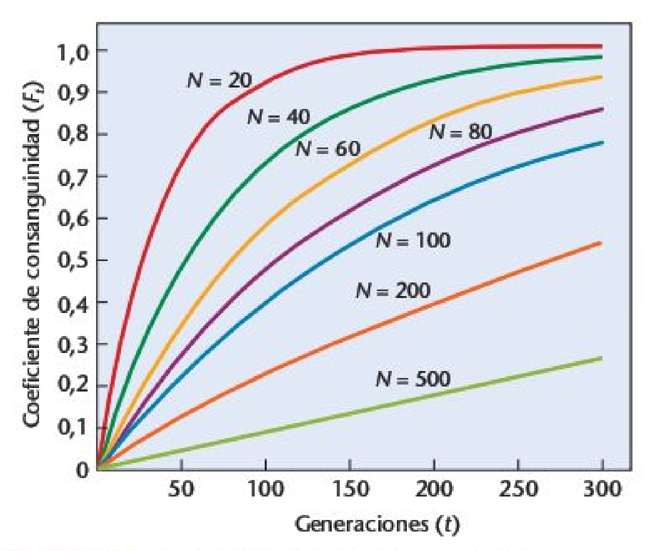


FIGURA 27.5 Incremento teórico del coeficiente de consanguinidad (*F*) en poblaciones con diferentes tamaños efectivos poblacionales, o N_e.

Ahora resuelva esto

En el Problema 27.1 de la página 792 se le pide que calcule los tamaños poblacionales efectivos, las frecuencias de los heterozigotos y el coeficiente de consanguinidad de una población de chacales que disminuyó drásticamente y luego se recuperó.

Sugerencia: Primero calcule N_e para cada generación y recuerde que la frecuencia de heterozigotos y el coeficiente de consanguinidad están inversamente relacionados.

¿Qué efectos tiene la consanguinidad en la supervivencia a largo plazo de una población? En algunos casos, puede no reducir inmediatamente la cantidad de variación genética presente en el conjunto de genes de una especie en la que el número de individuos permanece alto. Por ejemplo, las plantas que se autopolinizan presentan a menudo altos niveles de homozigosis y relativamente poca variación genética en una población. Sin embargo, tienden a tener considerable variación genética entre poblaciones distintas, cada una de ellas adaptada a condiciones ambientales locales ligeramente diferentes. Por otro lado, en muchas especies con fecundación cruzada, como los mamíferos, la consanguinidad está asociada con la reducción de la eficacia y menores tasas de supervivencia entre los descendientes. Esta **depresión consanguínea** puede resultar del aumento de homozigosis para alelos deletéreos. El número de alelos deletéreos presentes en el conjunto de genes de una población se llama **carga genética** (o lastre genético).

En algunas especies, la consanguinidad, acompañada de la selección en contra de los individuos homozigotos para alelos deletéreos menos aptos, tiene como resultado eliminar dichos

Seminario Web 27.1
Deriva genética

alelos del conjunto de genes, un proceso conocido como *purgado del lastre genético*. Las especies que han purgado con éxito su lastre genético no presentan reducción continuada de la eficacia, incluso después de muchas generaciones de consanguinidad. Esto es cierto en numerosas especies domésticas, especialmente en plantas que se autopolinizan, como el trigo. Sin embargo, experimentos de simulación con ordenador han demostrado que el proceso de purga completo puede durar 50 generaciones o más, pudiendo darse depresión consanguínea durante dicho tiempo.

Alternativamente, la depresión consanguínea puede resultar de individuos heterozigotos que tengan un nivel de eficacia mayor que cualquiera de los dos homozigotos. En este caso, la supervivencia a largo plazo de la población requiere que se evite la consanguinidad y que se mantengan los niveles de todos los alelos en el conjunto de genes. Estos requerimientos pueden ser difíciles en especies que ya han sufrido una reducción significativa del tamaño poblacional.

Los efectos de la depresión consanguínea y de la pérdida de variación en poblaciones pequeñas aisladas han sido documentados en el caso de los lobos grises de la Isla Royale (Figura 27.6). Hacia 1950, una pareja de lobos grises aparentemente cruzó un puente de hielo desde el continente canadiense a la Isla Royale del lago Superior. La isla no tenía lobos y tenía abundancia de alces, que fueron la principal fuente de alimento de los lobos. Hacia 1980, la población de lobos de la isla Royale había aumentado hasta unos 50 individuos. Sin embargo, en la década siguiente el número de lobos disminuyó a menos de una docena, sin haber nacido nuevas camadas, a pesar de la abundancia de alimento y de no haber signos aparentes de enfermedades. Se examinó la variación genética de los lobos que quedaban mediante el análisis del mtDNA y de la huella del DNA nuclear. Se encontró que los lobos de la isla Royale tenían unos niveles de homozigosis doble que los lobos de una población cercana del continente. Además, todos los lobos tenían el mismo genotipo del mtDNA, lo que estaba de acuerdo con la descendencia de la misma hembra. Por ello, el grado de parentesco entre los lobos de la isla Royale era equivalente a la de hermanos completos, sugiriendo que el fallo reproductivo de los lobos se debía a depresión consanguínea, un fenómeno que también se ha observado en poblaciones cautivas de lobos.



FIGURA 27.6 Lobo gris de la isla Royale (*Canis lupus*).

Reducción del flujo génico

El **flujo génico**, el intercambio gradual de alelos entre dos poblaciones, se consigue mediante la dispersión de gametos o la migración de individuos. Es un mecanismo importante para introducir nuevos alelos en un conjunto de genes e incrementar la variación genética. La migración es la ruta principal del flujo génico en animales; en el Capítulo 25 examinamos el efecto de la migración y del flujo génico en las frecuencias alélicas de la población. En los vegetales, el flujo génico no se produce por el desplazamiento de los individuos sino como consecuencia de la polinización cruzada entre poblaciones distintas y, en cierto grado, mediante la dispersión de las semillas. El aislamiento y fragmentación de las poblaciones en especies raras y en declive reduce el flujo génico significativamente y el potencial para mantener la diversidad genética. Como ya hemos discutido, la pérdida de hábitat es el mayor peligro para la supervivencia de las especies. No es raro que especies amenazadas o en peligro de extinción queden restringidas a pequeñas bolsas separadas de hábitats residuales. Esto aísla y fragmenta las poblaciones supervivientes de tal manera que no puede darse entre ellas el desplazamiento de los individuos, evitando así el flujo génico.

El término **metapoblación** se utiliza para describir una población con subpoblaciones separadas espacialmente con flujo génico limitado, especialmente si con el tiempo se producen extinciones locales y sustituciones de algunas de las subpoblaciones. Una metapoblación bien estudiada es la del amenazado carpintero con escarapela roja (*Picoides borealis*) (Figura 27.7),

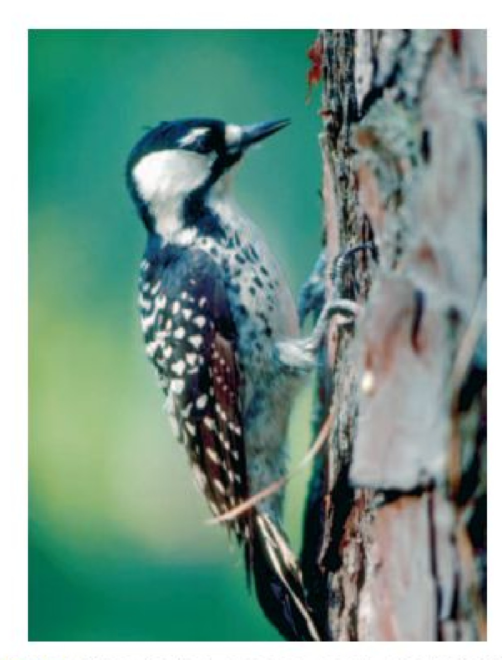


FIGURA 27.7 El carpintero con escarapela roja (*Picoides borealis*).

que fue corriente en los bosques de pinos a lo largo del sudeste de los Estados Unidos. La pérdida de hábitat debido a la tala ha reducido las poblaciones de este pájaro a pequeños lugares aislados y dispersos, prácticamente sin migración entre ellos. Estudios utilizando alozimas y perfiles de DNA demuestran que las poblaciones de carpinteros más pequeñas que sobreviven (en donde $N = <100$) han sufrido la mayor pérdida de diversidad genética y están en gran riesgo de depresión consanguínea respecto de las poblaciones más grandes en donde $N = >100$. En la actualidad, la gestión del carpintero incluye esfuerzos en incrementar la diversidad genética de las poblaciones más pequeñas, introduciendo pájaros de distintas poblaciones grandes para recrear artificialmente un flujo génico por migración que se habría dado en la distribución original no fragmentada de la especie.

27.4 La erosión genética disminuye la diversidad genética

La pérdida de la diversidad genética por una población o especie se denomina **erosión genética**. ¿Por qué es importante si una población pierde diversidad genética, especialmente si el número de individuos se mantiene alto? La erosión genética tiene dos efectos importantes en la población. Primero, puede dar lugar a la pérdida de potenciales alelos útiles del conjunto de genes, reduciendo así la capacidad de la población para adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes e incrementando el riesgo de extinción. Varias décadas antes del advenimiento de la genética moderna, Charles Darwin reconocía la importancia de la diversidad para la supervivencia de las especies a largo plazo y su éxito evolutivo. En *On the Origin of Species* (1859) Darwin escribió,

> Cuanto más diversificada sea la descendencia de cualquier especie ... más capaz será de aprovecharse de los muchos sitios ampliamente diversificados en la comunidad natural, y así incrementar en número.

La historia de la polilla *Biston betularia* en el siglo XIX ilustra la importancia del mantenimiento de la diversidad alélica en el conjunto de genes. El alelo que da lugar al fenotipo melánico más oscuro no confería ninguna ventaja obvia a las especies hasta que el hábitat de las polillas se alteró significativamente en ciertas áreas de Gran Bretaña como consecuencia del aumento de la industrialización y de la polución consiguiente. Sin embargo, la presencia continuada de alelos melánicos en el conjunto de genes de la polilla le permitió adaptarse a las nuevas condiciones ambientales y sobrevivir, de la misma manera que la persistencia de alelos no melánicos en la población le permite ahora a la polilla readaptarse a su cambio de ambiente una vez mas. ¿Qué le podría haber sucedido a la polilla si se hubiera perdido el alelo melánico de su conjunto de genes antes de la revolución industrial?

El segundo efecto importante de la erosión genética es la reducción de los niveles de heterozigosis. A nivel de población, una heterozigosis reducida se reflejará en un aumento del número de homozigotos para un locus dado. A nivel individual, se producirá una disminución del número de loci heterozigotos en el genotipo de una planta o animal dados. Como ya hemos vista, la pérdida de heterozigosis es una consecuencia corriente de un tamaño poblacional reducido. Los alelos pueden perderse por deriva genética o porque los individuos que los llevan mueren sin reproducirse. Las poblaciones pequeñas también aumentan la probabilidad de consanguinidad, que inevitablemente aumenta la homozigosis.

Obviamente, una vez que un alelo se ha perdido de un conjunto de genes, la heterozigosis potencial se reduce enormemente o se elimina completamente si hay sólo dos alelos en el locus en cuestión y uno ha quedado fijado. El nivel de homozigosis que puede ser tolerable varía con las especies. Los estudios de poblaciones que presentan niveles de homozigosis mayores de lo normal demuestran un rango de efectos deletéreos, como reducción de la viabilidad del esperma y anormalidades en la reproducción en los leones africanos, aumento de la mortalidad en la descendencia de elefantes marinos y reducción del éxito de la nidada en carpinteros.

Hasta ahora, en estudios de campo no han aparecido pruebas que relacionen de manera concluyente la extinción de una población silvestre con la erosión genética. Sin embargo, en estudios de laboratorio utilizando *Drosophila melanogaster* para modelizar sucesos evolutivos, se muestra que la pérdida de variación genética reduce la capacidad de una población para adaptarse a condiciones de cambio ambiental. Las moscas de la fruta, con su pequeño tamaño y tiempo de generación corto de sólo 10 a 14 días, son organismos modelo útiles para estudiar sucesos evolutivos, especialmente debido a que se pueden obtener fácilmente grandes poblaciones y mantenerlas durante muchas generaciones.

En una serie de experimentos llevados a cabo por científicos de la Macquarie University de Sydney, Australia, poblaciones de *Drosophila* se redujeron hasta una sola pareja durante tres generaciones para simular cuellos de botella poblacionales y luego se les permitió que aumentasen en número. La capacidad de las poblaciones que pasaron por un cuello de botella para tolerar niveles incrementados de cloruro sódico se comparó con la de poblaciones normales no consanguíneas. Los investigadores encontraron que las poblaciones que pasaron por un cuello de botella se extinguieron a concentraciones más bajas de sal (Figura 27.8).

Otros experimentos comparando poblaciones de *Drosophila* consanguíneas y no consanguíneas expuestas a ambientes estresantes, como elevadas temperaturas y presencia de etanol, han demostrado que las poblaciones incluso con bajos niveles de consanguinidad tienen una mayor probabilidad de extinguirse a niveles bajos de estrés ambiental que poblaciones no consanguíneas. Resultados experimentales como estos indican que la erosión genética realmente reduce la viabilidad de una población a largo plazo, disminuyendo su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes.

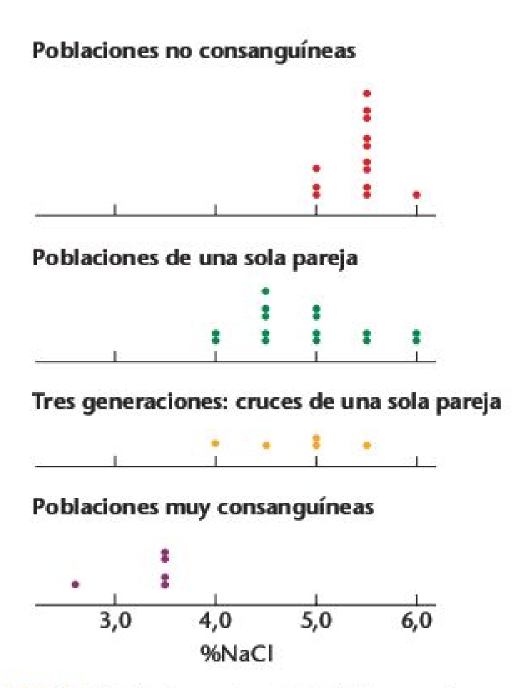


FIGURA 27.8 Efecto de cuellos de botella en varias poblaciones sobre el potencial evolutivo de *Drosophila*, como se muestra en las distribuciones de concentraciones de NaCl en la extinción.

27.5 La conservación de la diversidad genética es esencial para la supervivencia de las especies

Los científicos que trabajan en el mantenimiento de la diversidad biológica se enfrentan con varios dilemas. ¿Se deberían centrar en preservar poblaciones concretas, o deberían adoptar una estrategia más amplia intentando conservar no exactamente una especie, sino todas las plantas y animales interdependientes de un ecosistema? ¿Cómo puede mantenerse la diversidad genética en una especie cuyo número declina? ¿Puede restaurarse la diversidad genética que ha perdido una población? Los primeros esfuerzos conservacionistas se fijaban a menudo solo en el tamaño poblacional de una especie amenazada. Los biólogos reconocen ahora que en los esfuerzos conservacionistas se tiene que considerar una compleja acción recíproca de factores distintos, como la necesidad de examinar el hábitat y el papel de una especie dentro de un ecosistema así como la importancia de la variación genética para la supervivencia a largo plazo.

Conservación *ex-situ*: Cría en cautividad

La **conservación *ex-situ*** (del latín, fuera de sitio) implica sacar plantas o animales de su hábitat original para mantenerlos artificialmente en un zoológico o en un jardín botánico. Estas colecciones pueden formar luego la base de un programa de captura y cría.

Estos programas, en los que unos pocos individuos de una especie amenazada se retiran de la naturaleza y sus descendientes se crían en un ambiente protegido para reconstruir la población, han sido un instrumento para traer de vuelta a cierto número de especies al borde de la extinción. Sin embargo, tales programas pueden tener consecuencias genéticas indeseables, que potencialmente pongan en peligro la supervivencia de la especies a largo plazo, incluso después de que se haya restablecido el tamaño poblacional. Un programa de captura y cría raramente se inicia hasta que en la naturaleza quedan muy pocos individuos, cuando la diversidad genética original de la especie ya se ha reducido. El programa de mejora se basa normalmente en un pequeño número de individuos capturados, por lo que la diversidad se reduce aun más por efecto fundador. Ya que la captura y cría se conforma a menudo con solo un pequeño número de individuos del grupo de apareamiento, la consanguinidad es difícil de evitar, especialmente en especies animales que forman harenes (grupo de hembras dominadas por un solo macho), por lo que N_e es considerablemente menor que N. Finalmente, la selección no intencionada de genotipos más adaptados a las condiciones de captura y cría pueden reducir con el tiempo la capacidad global de la población recuperada para adaptarse a sobrevivir en la naturaleza.

¿Como se puede gestionar este tipo de programas para minimizar estos efectos genéticos? Como ya hemos visto, la pérdida de diversidad genética medida como heterozigosis en t generaciones se puede expresar como

$$H_t/H_0 = (1 - 1/2N_e)^t$$

Esta ecuación indica que la pérdida de diversidad genética H_t/H_0 será mayor con un menor tamaño poblacional efectivo N_e y un número grande de generaciones t. Podemos ampliar esta ecuación para una población por captura y cría como sigue:

$$H_t/H_0 = [1 - (1/2N_{fo})]\{1 - 1/[2N(N_e/N)]\}^{t-1}$$

en donde N_{fo} es el tamaño efectivo de la población fundadora, N es el tamaño medio poblacional y N_e es la media del tamaño poblacional efectivo del grupo a lo largo de t generaciones. Examinando esta ecuación, se ve que la diversidad genética máxima de un grupo capturado se mantendrá (1) utilizando el mayor número posible de individuos fundadores para maximizar N_{fo}, (2) maximizando N_e/N de tal manera que tantos individuos como sea posible produzcan descendientes en cada generación y (3) minimizando el número de generaciones en cautividad para reducir t. La importancia de maximizar N_{fo} para incrementar la diversidad alélica en la población fundadora también se puede ver en la Figura 27.9. Programas de este tipo que tengan éxito para especies amenazadas tienen que gestionarse con estos tres objetivos en mente. Además, confeccionando buenos registros genealógicos para evitar cruces entre parientes e intercambiando individuos entre diferentes programas de mejora cuando sea posible, reducirá la consanguinidad.

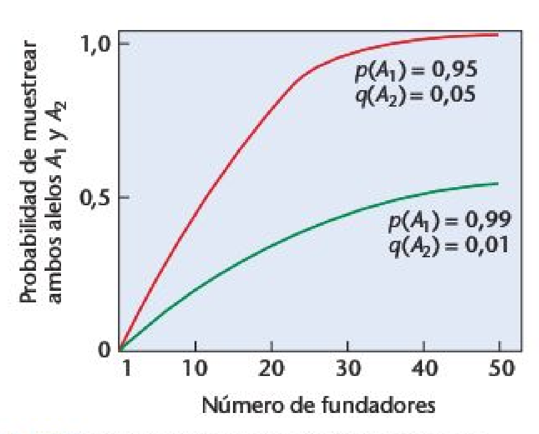


FIGURA 27.9 Efecto del número de fundadores en poblaciones en cautividad sobre la probabilidad de muestrear ambos alelos A y a de un locus.

Ahora resuelva esto

En el Problema 27.14 de la página 792 se le pide que estime el potencial de la erosión genética en una población cautiva de raros pandas rojos.

Sugerencia: Si N_e/N se mantiene en 0,42 y el tamaño real de la población es de 50, se puede calcular N_e. Luego utilice la ecuación que se da más arriba.

Cría en cautividad: el hurón de pies negros

El hurón de pies negros, *Mustela nigripes* (Figura 27.10), es un ejemplo excelente de una especie que ha estado sujeta a cruces en cautividad con éxito. Este hurón se extendía a lo largo de las llanuras del oeste de los Estados Unidos, pero hacia 1970 se consideró extinguido. Décadas de trampas y venenos tanto contra el hurón como contra su principal presa, el perrito de las praderas, habían diezmado sus poblaciones. Sin embargo, en 1981 se descubrió una pequeña colonia en un rancho, cerca de Meeteetse, Wyoming. Biólogos de la conservación intentaron primero conservar esta población de hurones *in situ*, pero en 1985 la colonia se infecto del moquillo canino que casi la arrasó. De los 18 hurones que se salvaron y se transfirieron en cautividad, solo 8 se consideraron suficientemente no emparentados como para convertirlos en fundadores. El programa de cruces ha dado lugar a más de 3.000 hurones y la especie está ahora reintroduciéndose en zonas de su rango original. El objetivo es establecer una población de 1.500 hurones en colonias silvestres sostenibles hacia 2010.



FIGURA 27.10 El hurón de pies negros (Mustela nigripes).

El pequeño grupo fundador de ocho individuos dio lugar en esta especie a un riguroso cuello de botella. Una pérdida adicional de diversidad genética ocurrió durante el programa de cría en cautividad debido a la deriva, a la producción limitada de varias de las hembras fundadoras y a un elevado grado de consanguinidad de uno de los machos fundadores. El riesgo de consanguinidad y de posterior erosión genética en este tipo de programas todavía es un problema.

Estrategias genéticas de gestión, como utilizar marcadores de DNA para identificar los individuos con más variabilidad genética, el mantenimiento de cuidadosos registros genealógicos para evitar el cruce entre animales íntimamente emparentados y técnicas desarrolladas para la inseminación artificial y la criopreservación de esperma, han ayudado a conservar la diversidad genética que quedaba en esta especie. Los genéticos de la conservación que trabajan en el proyecto de recuperación estiman que todos los hurones de pies negros que existen comparten alrededor de un 12 por ciento de su genoma. Esto es equivalente, aproximadamente, a ser primos hermanos. Los efectos de este grado de semejanza genética en la población de hurones en expansión no son claros. Ocasionalmente se han observado anormalidades en la población cautiva, como pies palmeados y colas retorcidas o cortas, pero sin ninguna población no consanguínea con la que comparar, no está claro si esto es una prueba de que la consanguinidad está aumentando la homozigosis de alelos deletéreos.

Los científicos no están de acuerdo en si el futuro a largo plazo del hurón de pies negros está comprometido por el grave cuello de botella y la posterior pérdida de diversidad genética que la especie ha sufrido. Algunos genéticos sugieren que debido a que la población de Meeteetse estuvo tan aislada, pudo haber tenido suficiente consanguinidad como para purgar cualquier alelo deletéreo. Otros investigadores señalan que los estudios de DNA del hurón de pies negros extraído de especímenes de museo demuestra que los hurones que viven hoy han perdido una significativa diversidad genética comparada con la de poblaciones antes del cuello de botella, y sugieren que la pérdida de eficacia debida a la consanguinidad se manifestará inevitablemente con el tiempo.

Conservación *ex situ* y bancos de genes

Otra forma de la conservación *ex situ* es el establecimiento de **bancos de germoplasma**. En contraste con alojar animales o plantas, estas colecciones proporcionan un almacenamiento y conservación a largo plazo de componentes reproductivos, como esperma, óvulos y embriones congelados en el caso de

animales, y semillas, polen y cultivo de tejidos en el caso de vegetales. En un banco de germoplasma se pueden conservar durante largos periodos muchos más genotipos individuales que en una colección viva. Gametos o semillas crioconservados se pueden utilizar para reconstituir animales o vegetales perdidos o amenazados después de muchos años de almacenamiento. Ya que son caros de construcción y mantenimiento, muchos bancos de germoplasma se utilizan para conservar estos componentes de especies domésticas que tienen valor comercial.

En muchos países se han establecido bancos de germoplasma para ayudar en la conservación de material genético de importancia agrícola, como variedades de plantas tradicionales que ya no se cultivan, o antiguas razas de ganado que han llegado a ser raras. Una de las colecciones más importantes *ex situ* en los Estados Unidos es el Centro Nacional para la Conservación de los Recursos Genéticos, un servicio del Departamento de Agricultura (USDA) en Fort Collins, Colorado, que mantiene más de 300.000 registros de variedades de plantas cultivadas y de especies silvestres relacionadas. Algunos de los registros se almacenan como semillas y otros como tejidos conservados criogénicamente, de los que se pueden regenerar plantas adultas. (Véase la fotografía inicial de este capítulo.) En este servicio también se conservan los recursos genéticos animales, como semen y embriones congelados, de especies amenazadas.

La conservación *ex situ* utilizando bancos de germoplasma, aunque a menudo es vital, tiene varias desventajas. El problema principal con los bancos de germoplasma es que incluso las grandes colecciones no pueden contener toda la variación genética presente en una especie. Los genéticos de la conservación intentan encararse a este problema identificando una **colección básica** para una especie. La colección básica es una serie de genotipos individuales que representan, tanto como sea posible, la variación genética de la especie; conservar la colección básica es prioritario sobre la conservación y preservación de un gran número de genotipos aleatorios. Otra desventaja de la conservación *ex situ* es que las condiciones artificiales bajo las que una especie se conserva en una colección viva o en un banco de germoplasma, crea a menudo su propia presión de selección. Por ejemplo, cuando las semillas de una rara especie vegetal se almacenan en frío, puede darse selección para aquellos genotipos mejor adaptados para soportan las bajas temperaturas y se podrían perder genotipos que realmente tendrían mayor eficacia en el ambiente natural de la planta. Otro problema que todavía se plantea en la conservación *ex situ* es que mientras que la mayor diversidad biológica, tanto en especies domésticas como no domésticas, se encuentran normalmente en países no desarrollados, muchas colecciones *ex situ* se sitúan en países desarrollados que tienen los recursos para establecerlas y mantenerlas. Esto da lugar a un conflicto sobre la propiedad y quien tiene acceso a los valiosos recursos genéticos potenciales mantenidos en tales colecciones.

Conservación *in situ*

La **conservación** *in situ* intenta preservar el tamaño poblacional y la diversidad biológica de una especie mientras se mantiene en su hábitat original. La utilización de inventarios de especies para identificar diversos sitios calientes es una herramienta importante para determinar los mejores sitios para establecer parques y reservas en donde los vegetales y animales puedan ser protegidos de la caza o de la recolección y en donde se pueda conservar su hábitat.

Para especies domésticas, hay un creciente interés en preservarlos en «granjas», en donde los granjeros son estimulados con recursos adicionales e incentivos económicos para mantener las variedades de plantas cultivadas tradicionales y razas de ganado. También se han elegido especies no domésticas con potencial económico para su preservación *in situ*. En 1998, el USDA estableció sus primeros lugares para conservación *in situ* de una planta silvestre para proteger poblaciones de la vid de roca nativa (*Vitis rupestris*) en varios estados orientales. La vid de roca es valiosa para los viticultores, no por sus frutos, sino por sus raíces; vides injertadas en rizomas de la vid de roca silvestre son resistentes a la filoxera, una grave plaga de los viñedos.

La ventaja de la conservación *in situ* para la vid de roca, como para otras especies, es que se puede mantener una población más grande con mayor diversidad genética. Las especies conservadas *in situ* también continúan viviendo y reproduciéndose en los ambientes en los que se habían adaptado, reduciendo la probabilidad de nuevas presiones de selección que produzcan cambios indeseables en las frecuencias de los alelos. Sin embargo, como la población humana continúa aumentando, aislar áreas adecuadas para la conservación *in situ* es un gran reto. Por ejemplo, en el caso del oso pardo de Norteamérica, incluso en grandes reservas, como el parque nacional de Yellowstone, puede estar eliminada en una especie la migración y el flujo génico con la consecuente pérdida de diversidad genética. Este problema es incluso más agudo áreas más pequeñas y fragmentadas, de hábitat protegido.

Acrecentamiento de la población

¿Qué consideraciones genéticas deberían acompañar a los esfuerzos para restaurar poblaciones o especies que están en declive? Como ya hemos visto, las poblaciones que pasan por un cuello de botella continúan sufriendo bajos niveles de diversidad genética, incluso después de que se haya recuperado su tamaño. También hemos visto que la consanguinidad y la deriva contribuyen a la erosión genética en poblaciones pequeñas, y la fragmentación interrumpe la migración y el flujo génico, reduciendo aun más la diversidad. Los programas de captura y cría diseñados para restaurar especies amenazadas críticamente a partir de unos pocos individuos supervivientes, tiene el riesgo de la erosión genética en la población renovada por efecto fundador y consanguinidad, como en el caso del hurón de pies negros.

Una estrategia alternativa, utilizada por los biólogos de la conservación, es el **acrecentamiento de la población** —incrementar el tamaño de una población en declive trasladando y soltando individuos de la misma especie capturados o recolectados en poblaciones más numerosas de otros lugares. Anteriormente se describieron intentos para volver a establecer el flujo génico en poblaciones muy fragmentadas del amenazado carpintero con escarapela roja mediante el acrecentamiento de las poblaciones más pequeñas. Otros proyectos de acrecentamiento de población en los Estados Unidos han implicado a las cabras de grandes cuernos y al oso pardo en las Montañas Rocosas. Este método también se ha empleado con el puma de Florida, *Felis coryi* (Figura 27.11), utilizando una población aislada de menos de 50 animales confinados en una zona alrededor del Big Cypress Swamp y del Everglades National Park en el sur de Florida. Como se discutirá en Genética, Tecnología y Sociedad al final de este capítulo, los patrones del perfil del DNA muestran altos niveles de consanguinidad en el puma de Florida, con eficacia reducida debido a graves anormalidades reproductivas y aumento de la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. En este esfuerzo, siete animales no emparentados de una población cautiva de pumas de América del Norte y del Sur, se soltaron en los Everglades en la década de 1960 y se les permitió cruzarse con la población de Florida, produciendo así grupos familiares con más diversidad genética. Sin embargo, posteriores acrecentamientos en esta especie han sido controvertidos, ya que muchos biólogos arguyen que los rasgos únicos que permiten clasificar al puma de Florida como una subespecies distinta se perderán si tiene lugar cruces con otros pumas.

A pesar de tales controversias, el acrecentamiento poblacional parece que es una herramienta válida de restauración. Esta estrategia aumenta el tamaño poblacional, así como la diversidad genética si los individuos transplantados no están emparentados con los de la población en donde se introducen. Sin embargo, un problema potencial con el acrecentamiento de la población es el **encharcamiento genético.** Esto ocurre cuando el conjunto de genes de una población es arrollado por genotipos diferentes de los individuos transplantados, alterando así las frecuencias alélicas.

Otra dificultad con el acrecentamiento poblacional puede estar ocasionado por **depresión no consanguínea**, que da lugar a una eficacia reducida en la descendencia de cruces entre individuos genéticamente diversos. Se cree que la depresión no consanguínea, que ocurre en la generación F_1, se debe a que los descendientes están menos adaptados a las condiciones ambientales locales que los padres.

Este fenómeno se ha documentado en algunas especies vegetales en las que se utilizaron semillas de la misma especie —pero de una localidad diferente— para repoblar un área dañada. La depresión no consanguínea que ocurre en F_2 y generaciones siguientes se piensa que se debe a la desorganización de **complejos génicos coadaptados** —grupos de alelos que han evolucionado para actuar juntos y dar lugar al mejor nivel de eficacia de un individuo. Este tipo de depresión no consanguínea se ha documentado en descendientes híbridos F_2 de cruces entre peces de diferentes poblaciones de salmones de Alaska. Estos estudios sugieren que restaurar el tipo más beneficioso y la cantidad de diversidad genética de una población, es más complicado de lo que previamente se creía, reforzando el argumento de que la mejor estrategia a largo plazo para la supervivencia de las especies es evitar en primer lugar la pérdida de diversidad.

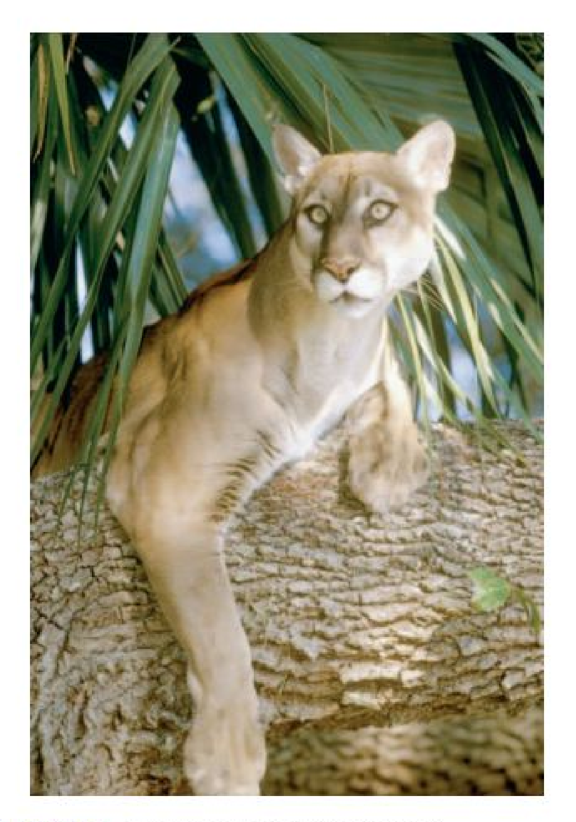


FIGURA 27.11 El puma de Florida (*Felis coryi*).



Genética, tecnología y sociedad

Conjuntos génicos y especies amenazadas: la grave situación del puma de Florida

En los últimos 400 años, se han extinguido en la Tierra más de 700 especies vegetales y animales. En la última década, solo en los Estados Unidos se han extinguido al menos 30 especies. Además, cientos de especies vegetales y animales genéticamente distintas está ahora amenazadas. Esta dramática pérdida de diversidad biológica es consecuencia directa de la actividad humana. A medida que los humanos aumentan en número y se extienden sobre la superficie de la Tierra, nos aprovechamos más y más de los recursos de la Tierra para nuestro beneficio. Como consecuencia de estas actividades, hemos talado bosques, polucionado las aguas y alterado permanentemente el equilibrio natural de la Tierra.

Aunque la destrucción continúa, estamos comenzando a entender las implicaciones de nuestros actos y hacemos esfuerzos para salvar algunas de las formas de vida más amenazadas. Sin embargo, a pesar de nuestros mejores esfuerzos para salvar especies amenazadas, a menudo llegamos demasiado tarde, después de que el tamaño poblacional ha sufrido un grave declive y después de haber comprometido permanentemente a ecosistemas importantes. Como consecuencia, gran parte de la diversidad genética que existía en estas especies se ha perdido y las poblaciones se deben reconstruir a partir de conjuntos de genes reducidos. Esta uniformidad genética puede reducir la eficacia, así como exponerla a enfermedades genéticas. La eficacia reducida puede disminuir aun más los números de las plantas o animales amenazados y la población caer en espiral hacia la extinción.

La historia del puma de Florida proporciona un ejemplo dramático de un animal llevado al borde de la extinción y los retos que se deben superar para restaurarlo a un lugar saludable en el ecosistema. El puma de Florida es una de las 30 subespecies de puma y es uno de los mamíferos más amenazados del mundo. Los pumas vagaron una vez por la esquina sudeste de Norteamérica, desde Carolina del Sur y Arkansas hasta el extremo sur de Florida. A medida que las gentes se asentaron en los hábitats del puma, los pumas se consideraron un peligro para el ganado y los humanos. Por ello los pumas fueron eliminados por caza, venenos, colisiones en las autopistas y pérdida del hábitat que soportaba a sus presas-principalmente ciervos y cerdos silvestres. En 1967, se consideró a los pumas de Florida como especie amenazada y sólo quedaban unos 30 pumas. Las estimas poblacionales predecían que el puma de Florida se extinguiría hacia el año 2055.

Debido a unas 20 generaciones de aislamiento geográfico y consanguinidad, los pumas de Florida tenían los niveles de heterozigosis genética más bajos que cualquier subespecie de puma. La pérdida de diversidad genética se manifestaba por la aparición de algunos graves defectos genéticos. Por ejemplo, casi el 80 por ciento de los machos nacidos después de 1989 en la región de Big Ciprés mostraban una rara enfermedad heredable (dominante autosómica o recesiva ligada al X) llamada criptorquidia —fallo en el descenso de uno de los dos testículos. Este defecto está asociado con bajos niveles de testosterona y número reducido de espermatozoides. También aparecieron en la población de pumas de Florida graves defectos congénitos del corazón, posiblemente debido a un gen autosómico dominante defectuoso. Además, aparecieron algunas deficiencias inmunológicas, haciendo a la pequeña población de pumas más susceptible a enfermedades y contribuyendo más al declive poblacional. Aparecieron otros rasgos genéticos menos graves, como colas retorcidas o espirales de pelaje en la espalda.

En las dos últimas décadas, surgió una débil luz de esperanza para los pumas de Florida. El estado y las agencias federales, así como personas privadas, están llevado a cabo un programa de recuperación del puma de Florida. El objetivo del programa es sobrepasar el número de 500 animales hacia el año 2010. Si tiene éxito, el puma tendrá un 95 por ciento de probabilidades de sobrevivir mientras que se mantenga por encima del 90 por ciento su diversidad genética. El plan incluye un programa de captura y cría, protección estricta, incremento y mejora del hábitat del puma y educación del público y de los propietarios privados de tierras. En las autopistas se han construido pasos a desnivel en el territorio del puma y estos han reducido significativamente las muertes del puma en las autopistas (que explicaban cerca de la mitad de las muertes de pumas). En 2002, el número de pumas de Florida se había incrementado hasta unos 100 animales.

Para retardar los efectos perjudiciales de la consanguinidad, en 1995 se soltaron en el territorio del puma de Florida ocho hembras silvestres de pumas de Texas (una subespecie emparentada del oeste de Texas). Tres de las hembras murieron antes de criar, sin embargo, las restantes hembras de Texas tuvieron camadas de gatitos saludables. Se estima que entre 40 y 70 de los 100 pumas del sur de Florida son híbridos de pumas de Texas y de Florida. Ninguno de los híbridos parece tener colas retorcidas u otras características de los pumas consanguíneos de Florida. Los pumas híbridos son genéticamente más diversos que los pumas de raza pura de Florida, con un 20 a un 30 por ciento de su material genético proporcionado por los pumas de Texas. Esto es de interés para algunos biólogos que están preocupados en que los pumas de Texas puedan encharcar genéticamente a la distinta población de pumas de Florida.

Paradójicamente, el éxito del programa de restauración ha sido un problema. Ahora que la población ha alcanzado unos 100 animales, el puma de Florida casi ha sobrepasado la capacidad de su hábitat actual. Los biólogos estiman que la población debe alcanzar al menos los 250 individuos a fin de poder automantenerse. Para alcanzar este número, los pumas necesitarán ampliar su territorio, poniéndose

de nuevo en competencia directa con la expansión humana en Florida. Los biólogos están evaluando ahora nuevos territorios potenciales para la creciente población de pumas de Florida-incluyendo partes de Luisiana. Arkansas y Carolina del Sur.

A pesar del reciente éxito del programa de restauración, la supervivencia del puma de Florida esta lejos de quedar asegurada. La vuelta de los pumas requerirá años de seguimiento e intervención frecuente. Además, las personas tienen que estar dispuestas a compartir su tierra con criaturas silvestres que son peligrosas y no tienen un interés directo para los humanos. Sin embargo, el apoyo público para la vuelta del puma de Florida ha sido grande, por lo que puede haber esperanza para este único e impresionante animal.

Referencias

Maehr, D.S., and Lacy, R.C. 2002. Avoiding the lurking pitfalls in Florida panther recovery. *Wildlife Soc. Bull.* 30(3):971-78.

Mansfield, K.G., and Land, E.D. 2002. Cryptorchidism in Florida panthers: Prevalence, features and influence of genetic restoration. *J. of Wildlife Diseases* 38(4):693-98.

Páginas Web

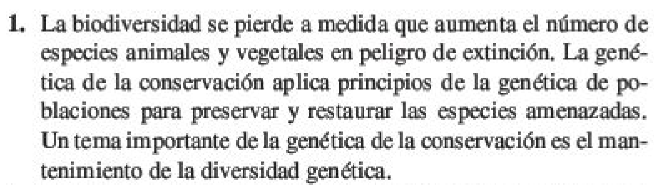
Derr, M. 2002. Florida panther's great leap hits a wall [online]. *The New York Times*, 15 October 2002.

http://www.nytimes.com/2002/10/15/science/life/15PANT.html

Florida Panther Net [online].

http://www.panther.state.fl.us/

RESUMEN DEL CAPÍTULO



1. La biodiversidad se pierde a medida que aumenta el número de especies animales y vegetales en peligro de extinción. La genética de la conservación aplica principios de la genética de poblaciones para preservar y restaurar las especies amenazadas. Un tema importante de la genética de la conservación es el mantenimiento de la diversidad genética.
2. La diversidad genética incluye la diversidad interespecífica, que viene reflejada por el número de especies distintas presentes en un ecosistema, y la diversidad intraespecífica, que es el reflejo de la variación genética dentro de una población o entre poblaciones diversas de la misma especie. La diversidad genética se puede medir examinando fenotipos diferentes de la población o, a nivel molecular, utilizando análisis de alozimas o técnicas de perfiles de DNA.
3. Los declives importantes en el número de individuos de las poblaciones de una especie reduce la diversidad genética y contribuye al riesgo de extinción como consecuencia de la deriva genética, de la consanguinidad y de la pérdida del flujo génico. Las poblaciones que sufren graves reducciones del tamaño efectivo y luego se recuperan, han pasado a través de un cuello de botella poblacional y a menudo presentan diversidad genética reducida.
4. La pérdida de diversidad genética reduce la capacidad de una población para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes debido a que los alelos útiles pueden haber desaparecido del conjunto de genes. La diversidad genética reducida también da lugar en la población a un mayor nivel de homozigosis, dando lugar a menudo a la acumulación de alelos deletéreos y a depresión consanguínea.
5. La conservación de la diversidad genética depende de métodos *ex situ*, como colecciones vivas, programas de captura y cría y bancos de genes, así como planteamientos *in situ*, como el establecimiento de parques y reservas.
6. El acrecentamiento poblacional, mediante el que los individuos son introducidos en una población en declive a partir de una población más numerosa de la misma especie localizada en otro lugar, se puede utilizar para aumentar el número y la diversidad genética. Sin embargo, este proceso viene acompañado del riego de depresión no consanguínea y del encharcamiento genético.

IDEAS Y SOLUCIONES

1. Una rara especie, encontrada fragmentada en varias subpoblaciones ¿es más vulnerable a la extinción que una especie igualmente rara encontrada como una gran población? ¿Qué factores se tendrían que considerar cuando se gestionan poblaciones fragmentadas de una especie rara?

Solución: Una especie rara, en la que los individuos que quedan están divididos en pequeñas subpoblaciones aisladas, puede parecer menos vulnerable. Si una subpoblación se extingue por causas locales, como enfermedades o pérdida de hábitat, las restantes subpoblaciones todavía pueden sobrevivir. Sin embargo, la deriva genética dará lugar a que las poblaciones más pequeñas experimenten más rápidamente un aumento de homozigosis con el tiempo comparadas con las poblaciones más grandes. Incluso con apareamiento aleatorio, el cambio de heterozigosis de una generación a la siguiente debido a deriva se puede calcular como

$$H_1 = H_0(1 - 1/2N)$$

en donde H_0 es la frecuencia de heterozigotos en la generación actual y N es el número de individuos de la población. Así, en una población pequeña de 50 individuos, con una frecuencia inicial de heterozigotos de 0,5, la heterozigosis disminuirá hasta $0{,}5(1 - 1/100) = 0{,}495$, una pérdida del 0,5 por ciento, en solo

una generación. En una población más grande de 500 individuos y con la misma frecuencia inicial de heterozigotos, después de una generación, la heterozigosis será $0,5(1 - 1/1000) = 0,4995$, una pérdida sólo del 0,05 por ciento.

Por consiguiente, es probable que poblaciones más pequeñas presenten los efectos de la homozigosis para alelos deletéreos más pronto que poblaciones más grandes, incluso con apareamiento aleatorio. Si las poblaciones están fragmentadas de tal manera que se evita el movimiento de los individuos o de los gametos entre ellas, las opciones de gestión podrían incluir el traslado de individuos de una subpoblación a otra para facilitar que se produzca flujo génico. Podría considerarse el establecimiento de «corredores para la vida silvestre» de habitats no alterados que conecten las poblaciones fragmentadas. En poblaciones en cautividad se puede llevar a cabo el intercambio de adultos para cría (o de sus gametos mediante el envío de semen o polen conservado). Sin embargo, la gestión para aumentar el tamaño de las poblaciones es vital para evitar una posterior erosión genética por deriva.

PROBLEMAS Y PREGUNTAS A DISCUSIÓN

1. Un biólogo naturalista estudió cuatro generaciones de una población de raros chacales etíopes. Cuando comenzó el estudio había 49 chacales en la población y el análisis de loci microsatélites de estos animales mostraba una frecuencia de heterozigotos de 0,55. En la segunda generación apareció en la población una enfermedad y sólo sobrevivieron hasta adulto 17 animales. Estos chacales tuvieron 20 descendientes, que a su vez dieron lugar a 35 descendientes en la cuarta generación. (a) ¿Cuál fue el tamaño poblacional efectivo de estas cuatro generaciones estudiadas? (b) Basándose en este tamaño poblacional efectivo, ¿cuál es la frecuencia de heterozigotos en la población de chacales en la cuarta generación? (c) ¿Cuál es el coeficiente de consanguinidad en la cuarta generación, suponiendo un coeficiente de consanguinidad $F = 0$ al comienzo del estudio, sin cambio en las frecuencias de los microsatélites del conjunto de genes y apareamiento al azar en todas las generaciones?

2. La condrodistrofia, una forma letal de enanismo, se ha encontrado recientemente en una población cautiva del cóndor de California que ha matado embriones en 5 de los 169 huevos fértiles. La condrodistrofia en el cóndor parece que está ocasionada por un alelo autosómico recesivo, con una frecuencia estimada de 0,09 en el conjunto de genes de esta especie. (a) ¿Cómo cree que se debe gestionar en el futuro las poblaciones del cóndor de California para minimizar el efecto de este alelo letal? (b) ¿Cuáles son las ventajas y desventajas en intentar eliminarlo del conjunto de genes?

3. Un genético está estudiando tres loci, cada uno con un alelo dominante y otro recesivo, en una pequeña población de una planta rara. Estima que las frecuencias de los alelos en cada uno de estos loci son $A = 0,75$, $a = 0,25$; $B = 0,80$, $b = 0,20$; $C = 0,95$, $c = 0,05$. ¿Cuál es la probabilidad de que todos los alelos recesivos se pierdan por deriva genética?

4. ¿Cuán similares son la deriva y la consanguinidad en cuanto a sus efectos en la población? ¿Cuán diferentes son?

5. Usted es el gestor de un parque de caza africano, con un rebaño nativo de 16 rinocerontes negros, una especie amenazada en todo el mundo. Describa como gestionaría su rebaño para establecer una población viable en el parque. ¿Qué factores genéticos se tendrían que considerar en su plan de gestión?

6. Compare las causas y efectos de la depresión consanguínea y de la depresión no consanguínea.

7. La clonación, utilizando técnicas similares mediante las que científicos escoceses obtuvieron la oveja Dolly, se ha propuesto como forma de aumentar el número de algunas especies de mamíferos en gran peligro de extinción. Discuta las ventajas y desventajas de utilizar tal planteamiento para ayudar a la supervivencia de las especies a largo plazo.

8. En una población de amapolas silvestres, que se encuentra en una remota región de las montañas del este de Méjico, casi todos los miembros tienen flores de color amarillo pálido, pero en experimentos de cruce se demuestra que el color amarillo pálido es recesivo respecto del color naranja fuerte. Utilizando las herramientas de la genética de la conservación descritas en este capítulo, ¿cómo se podría determinar experimentalmente si la prevalencia del fenotipo recesivo en la población de amapolas del este de Méjico se debe a selección natural o se debe simplemente a los efectos de la deriva genética y/o de la consanguinidad?

9. Compare las técnicas de la conservación *in situ* con las técnicas de la conservación *ex situ*.

10. Describa cómo se aplica la conservación *ex situ* mediante captura y cría en varias especies gravemente amenazadas.

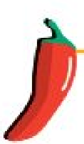
11. Explique porqué una baja diversidad genética en una especie es perjudicial para su supervivencia.

12. Compare el análisis de alozimas con el análisis de RFLP como medida de la diversidad genética.

13. Biólogos conservacionistas estudian en la naturaleza una población amenazada de gorilas de tierras bajas. Los biólogos cuentan 15 gorilas, pero observan que la población consta de dos harenes, cada uno dominado por un macho distinto. Un harén tiene ocho hembras y el otro cinco. ¿Cuál es el tamaño poblacional efectivo, N_e, de la población de gorilas?

14. Se capturan veinte pandas rojos amenazados para fundar un grupo. (a) ¿Cuál es la probabilidad de que al menos uno de los pandas capturados tenga el genotipo B_1/B_2, si $p(B_1) = 0,99$? (b) Una gestión cuidadosa mantiene la proporción N_e/N de la población de pandas rojos en 0,42. Si el tamaño total de la población capturada se mantiene en 50 individuos, ¿qué proporción de la heterozigosis presente en la población fundadora estará presente todavía después de 5 generaciones de cautividad?

15. Utilice su análisis de los pandas rojos del Problema 14 para sugerir la gestión de la población de captura y cría de pandas rojos para mantener tanta diversidad genética como sea posible.

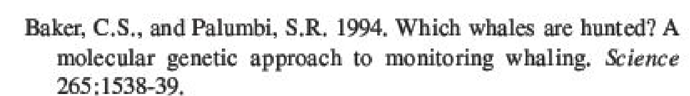


Problemas extra-picantes

16. Los caballos de Przewalski (*Equus przewalski*), que para algunos biólogos representan a la especie ancestral de la que fueron domesticados los modernos caballos, están clasificados como una especie distinta del caballo doméstico, aunque individuos de las dos especies se pueden cruzar y producir descendencia fértil. Los caballos de Przewalski fueron cazados hasta su extinción en su hábitat nativo en las estepas asiáticas hacia 1920. Los pocos cientos de caballos de Przewalski que viven actualmente descienden de 12 supervivientes que habían estado en cautividad. El grupo fundador también incluía a una yegua doméstica. Actualmente hay interés en reintroducir el caballo de Przewalski en su rango original. (a) ¿Qué factores genéticos asociados con los animales disponibles para su reintroducción cree que se deberían considerar antes de tomas una decisión? (b) ¿Qué consejos daría a los biólogos conservacionistas que gestionan el proyecto de reintroducción?
17. Cada vez más se usan los perfiles de DNA basados en tipos distintos de marcadores moleculares para medir los niveles de diversidad genética de las poblaciones de especies amenazadas y en peligro de extinción. ¿Cree que estas estimaciones de la diversidad genética basadas en marcadores son indicadores fiables del potencial de la población para sobrevivir y adaptarse en un ambiente natural? ¿Por qué sí o por qué no?
18. Los bancos de semillas proporcionan protección dirigida a la conservación de especies de importancia económica y no económica. Schoen y colegas (*Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 1998. 95:394-99) cuantificaron una considerable disminución de eficacia en semillas almacenadas largo tiempo. Cuando la germinación falla por debajo del 65-85 por ciento, se recomienda la regeneración (siembra y recolección de semillas) de una muestra finita de semillas tipo almacenadas. ¿Qué consecuencias genéticas se podrían esperar que acompañara a la práctica de conservación y regeneración de semillas almacenadas largo tiempo?
19. De acuerdo con Holmes (*Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 2001. 98:5072-77), «Una de las primeras preguntas que un gestionador de recursos se hace sobre especies amenazadas o en peligro de extinción es: ¿Cuán mal esta?» Más formalmente, la pregunta pide un análisis de la viabilidad de la población que incluye estimas del riesgo de extinción. ¿Qué factores se considerarían significativos para proporcionar una estima del riesgo de extinción de una especie?
20. Los loci microsatélites son repeticiones en tándem cortas (de 2 a 5 pares de bases) que están distribuidas abundantemente y algo aleatoriamente en todos los cromosomas de eucariotas. Presentan elevada mutabilidad, de tal manera que se producen nuevos alelos más frecuentemente que en los genes tradicionales que codifican proteínas. Es probable que muchos de los microsatélites sean selectivamente neutros y muy heterozigotos en poblaciones naturales. Sabiendo que los guepardos sufrieron un cuello de botella poblacional hace aproximadamente 12.000 años, los pumas de Norteamérica hace 10.000 años y los leones de Gir Forest hace 1.000 años, ¿en cuál de estas especies se esperaría el mayor grado de polimorfismo de microsatélites? ¿Y en cuál el menor?
21. Considerando el comportamiento y la evolución de los microsatélites descritos en el Problema 20, represente gráficamente la relación entre el polimorfismo de los microsatélites (varianza) y el número de años desde el cuello de botella de la especie. Seleccione varianzas de 1 a 0,9, en donde el incremento de varianza indica aumento del polimorfismo y fije el rango de años desde el cuello de botella de 10.000 a 50.000.
22. Las alozimas son formas electroforéticamente diferentes de una proteína dada, mientras que los microsatélites y minisatélites son secuencias de DNA repetitivas que se han encontrado en todos los eucariotas estudiados hasta el momento, Tales secuencias repetitivas están raramente asociadas con secuencias de DNA codificante. Los datos que se presentan representan el porcentaje de heterozigosis en alozimas, microsatélites y minisatélites en los genomas nucleares de cuatro especies de felinos (modificado de Driscoll et al. 2002. *Genome Res.* 12:414-23). (a) ¿Qué especie parece tener mayor variabilidad genética? ¿Por qué puede ser esta especie tan variable? (b) ¿Qué especie parece tener la menor variabilidad genética? (c) ¿Por qué las alozimas son menos variables que los minisatélites y microsatélites?

	% de heterozigosis			
Marcador	**Guepardo**	**León**	**Puma**	**Gato doméstico**
Alozimas	1,4	0,0	1,8	8,2
Minisatélites	43,3	2,9	10,3	44,9
Microsatélites	46,7	7,9	14,7	68,1

23. Si asumimos que una de las especies del Problema 22 ha sufrido una crisis poblacional reciente, en la que el número de progenitores efectivos ha alcanzado bajos niveles críticos, ¿cuál de ellas cree que sería?
24. Para muchos de los esfuerzos conservacionistas, los científicos no tienen suficientes datos para tomar decisiones definitivas de conservación. No obstante, la asignación de hábitats para la conservación no puede retrasarse hasta que se disponga de tales datos. En estos casos, los esfuerzos conservacionistas se dirigen a menudo hacia tres clases de especies: especies insignia (especies de perfil elevado), especies paraguas (especies que requieren hábitats grandes) e indicadoras de biodiversidad (especies que representan diversidad, especialmente en hábitats productivos) (Andelman and Fagan, 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. [USA]* 97:5954-59). Para proteger especies amenazadas, ¿qué ventajas y desventajas podrían acompañar invertir talento y recursos escasos en cada una de estas clases?



LECTURAS SELECCIONADAS

Baker, C.S., and Palumbi, S.R. 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* 265:1538-39.

Bonnell, M.L., and Selander, R.K. 1974. Elephant seals: Genetic variation and near extinction. *Science* 184:908-09.

Daniels, S.J., and Walters, J.R. 2000. Inbreeding depression and its effects on natal dispersal in red-cockaded woodpeckers. *Condor* 102:482-91.

Dobson, A., and Lyles, A. 2000. Black-footed ferret recovery. *Science* 288:985.

Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Ann. Rev. Genet.* 29:305-27.

Gharrett, A.J., and Smoker, W.W. 1991. Two generations of hybrids between even-year and odd-year pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*): A test for outbreeding depression? *Canadian J. Fish. Aquat. Sci.* 48:426-38.

Hedrick, P.W. 2001. Conservation genetics: Where are we now? *Trends Ecol. Evol.* 16:629-36.

Lacy, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J. Mammalogy* 78:320-35.

Paetkau, D., et al. 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conserv. Biol.* 12:418-29.

Palacios, C., and Gonzalez-Candelas, F. 1999. AFLP analysis of the critically endangered *Limonium cavanillesii*. *J. of Heredity* 90:485-89.

Ralls, K., et al. 2000. Genetic management of chondrodystrophy in California condors. *Animal Conserv.* 3:145-53.

Roman J., and Bowen, B.W. 2000. The mock turtle syndrome: Genetic identification of turtle meat purchased in the southeastern United States of America. *Animal Conserv.* 3:61-65.

Wayne, R.K., et al. 1991. Conservation genetics of the endangered Isle Royale gray wolf. *Conserv. Biol.* 5:41-51.

Wilson, E.O., (ed.). 1988. *Biodiversity*. Washington, DC: National Academy of Sciences.

Wynen, L.P., et al. 2000. Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal. *Mol. Ecol.* 9:299-314.

Apéndice A

Glosario

aberración cromosómica Cualquier cambio que de lugar a una duplicación, deleción o reordenación del material cromosómico.

acervo genético (conjunto de genes) El conjunto de todos los alelos que poseen los miembros reproductores de una población.

ácido desoxirribonucleico (DNA) Macromolécula que normalmente está formada por cadenas polinucleotídicas antiparalelas unidas por puentes de hidrógeno, en la que el residuo azúcar es la desoxirribosa. Es el portador principal de información genética.

ácido ribonucleico Ácido nucleico caracterizado por el azúcar ribosa y la pirimidina uracilo, normalmente un polinucleótido de cadena sencilla. Se reconocen varios tipos, como el RNA ribosómico, el RNA mensajero, el RNA de transferencia y el RNA nuclear heterogéneo.

adaptación Un componente heredable del fenotipo que confiere ventaja en la supervivencia y en el éxito reproductivo. Proceso mediante el que los organismos se adaptan a las condiciones ambientales normales.

adenosín monofosfato cíclico (cAMP) Importante molécula reguladora, tanto en procariotas como en eucariotas.

agente intercalante Compuesto que se inserta entre las bases de una molécula de DNA, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas complementarias (p.e., colorantes de acridina).

aislamiento reproductivo Ausencia de cruzamientos entre poblaciones, subespecies o especies. El aislamiento se puede producir por factores extrínsecos, como el comportamiento, y barreras intrínsecas, como la inviabilidad de los híbridos.

albinismo Trastorno causado por la ausencia de producción de melanina en el iris, pelo y piel. Muy a menudo se hereda como carácter recesivo autosómico en humanos.

alcaptonuria Enfermedad autosómica recesiva humana causada por la falta de la enzima ácido homogentísico oxidasa. La orina de los individuos homozigotos se vuelve oscura al contacto con el aire debido a la oxidación del ácido homogentísico excretado. Los cartílagos de los adultos homozigotos se vuelven negros por la deposición de un pigmento derivado del ácido homogentísico. A menudo, estos individuos desarrollan artritis.

alelo Uno de los posibles estados mutacionales de un gen, que se distingue de otros alelos por sus efectos fenotípicos.

alelo nulo Alelo mutante que no produce un producto génico funcional. Normalmente se hereda como un carácter recesivo.

alelos múltiples Tres o más alelos del mismo gen.

alolactosa Un derivado de la lactosa que actúa de inductor en el operon *lac*.

alopoliploide Poliploide formado por la unión de dos o más dotaciones de cromosomas distintos, con una duplicación posterior del número de cromosomas.

alotetraploide Diploide para dos genomas derivados de especies distintas.

alozima Forma alélica de una proteína que puede distinguirse de otras formas por electroforesis.

ambiente Conjunto de factores geográficos, climáticos y bióticos en el que viven los organismos.

aminoácido Cualquiera de las subunidades que se unen covalentemente para formar las proteínas.

aminoácido C-terminal Aminoácido terminal de una cadena polipeptídica que lleva un grupo carboxilo libre.

aminoácido N-terminal Aminoácido terminal de una cadena polipeptídica que tiene un grupo amino libre.

aminoacil tRNA Combinación de un aminoácido y de una molécula de tRNA unidos covalentemente.

amniocentesis Procedimiento utilizado para analizar defectos fetales en el que se extrae fluido y células fetales de la cavidad amniótica que envuelve al feto.

amplificación génica Proceso por el que se seleccionan secuencias de un gen para una replicación diferencial extracromosómica o intracromosómica.

anabolismo Síntesis metabólica de moléculas complejas a partir de precursores menos complejos.

anafase Fase de la división celular en la que los cromosomas comienzan a desplazarse a los polos opuestos de la célula.

anafase I Fase de la primera división meiótica en la que se separan los miembros de las parejas de cromosomas homólogos

análisis *cis-trans* Análisis genético para determinar si dos mutaciones están localizadas en el mismo cistrón.

análisis de ji-cuadrado (χ^2) Prueba estadística para determinar si una serie de datos observados se ajusta a los datos esperados teóricamente.

análisis de tétradas Método para el análisis del ligamiento y recombinación de genes, utilizando las cuatro células haploides que se producen en una división meiótica.

análogo de base Compuesto químico estructuralmente similar a otro, pero que se diferencia en un grupo funcional (p.e., 5-bromodesoxiuridina, es un análogo de la timidina).

anemia falciforme Enfermedad genética humana causada por un gen autosómico recesivo, generalmente mortal en condición ho-

mozigota. Está causada por la alteración de la secuencia aminoacídica de la cadena β de la globina.

aneuploidía Situación en la que el número de cromosomas no es exactamente múltiplo del número haploide.

anfidiploide Véase *alotetraploide*.

angstrom (Å) Unidad de longitud equivalente a 10^{-10} metros.

anotación Datos del análisis de secuencias mucleotídicas genómicas para identificar a los genes que codifican proteínas, a los genes que no codifican proteínas, a sus secuencias reguladoras y a sus funciones.

anticipación Fenómeno observado por primera vez en la distrofia miotónica, en donde la gravedad de los síntomas aumenta y la edad de aparición disminuye de generación en generación. Este fenómeno está ocasionado por la expansión de repeticiones de trinucleótidos dentro o cerca de un gen.

anticipación genética Fenómeno de un trastorno genético que aparece progresivamente a una edad más temprana, con un incremento de la gravedad de los síntomas en generaciones sucesivas. Véase *anticipación*.

anticodón Triplete de nucleótidos de una molécula de tRNA que es complementario y se une al triplete codón de una molécula de mRNA.

anticuerpo Proteína (inmunoglobulina) producida en respuesta a un estímulo antigénico, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno.

antígeno Molécula, generalmente una proteína de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos.

antígenos de histocompatibilidad Véase *HLA*.

antiparalelo Describe moléculas alineadas en paralelo, pero que discurren en direcciones opuestas. Generalmente se utiliza para describir la orientación opuesta de las dos cadenas de una molécula de DNA.

apareamiento aleatorio Cruce de individuos sin tener en cuenta el genotipo.

apoptosis Programa controlado genéticamente de muerte celular, activado como parte del desarrollo normal o como consecuencia de daño celular.

asca En los hongos, el saco que engloba a las cuatro u ocho ascosporas.

ascospora Espora meiótica que se produce en ciertos hongos.

atenuador Secuencia nucleotídica situada entre el promotor y el gen estructural de algunos operones que regula el tránsito de la polimerasa del RNA, reduciendo la transcripción del gen estructural relacionado.

ATP Trifosfato de adenosina. Nucleótido que es la principal fuente de energía de las células.

autofecundación En genética vegetal, la fecundación de los óvulos de una planta por el polen de la misma planta.

autogamia Proceso de autofecundación que da lugar a homozigosis.

autopoliploide Poliploide que resulta de la duplicación de una dotación diploide de cromosomas.

autorradiografía Producción de una imagen fotográfica por extinción radioactiva. Se utiliza para localizar compuestos marcados radiactivamente en células y en tejidos.

autosomas Cromosoma distinto de los cromosomas sexuales. En la especie humana hay 22 parejas de autosomas.

autotetraploide Autopoliploide compuesto por cuatro genomas similares. En esta situación, los genes con dos alelos pueden tener cinco clases genotípicas: *AAAA* (cuádruplex) *AAAa* (triplex), *AAaa* (duplex), *Aaaa* (simplex) y *aaaa* (nuliplex)

auxótrofo Microorganismo mutante o línea celular que necesita de una sustancia para crecer, que las cepas silvestres pueden sintetizar.

bacteria lisogénica Bacteria que lleva el DNA de un bacteriófago atenuado integrado en su cromosoma.

bacteriófago Virus que infecta bacterias (también, *fago*)

bacteriófago λ Miembro de la familia de virus lambdoide que atacan, infectan y se replican dentro de las bacterias, destruyendo en el proceso al huésped. Fagos lambda genéticamente modificados se utilizan como vectores en investigación del DNA recombinante.

bacteriófago μ Grupo de fagos cuyo material genético se comporta como una secuencia de inserción que puede inactivar al gen hospedador y reordenar los cromosomas del huésped.

bandeo cromosómico Técnica para teñir diferencialmente los cromosomas mitóticos o meióticos que da lugar a un patrón de bandas característico, o tinción selectiva de ciertas regiones cromosómicas, como centrómeros, regiones del organizador nucleolar y regiones ricas en GC o AT —no hay que confundirlo con el patrón de bandas que presentan los cromosomas politénicos, que se producen por el alineamiento de cromómeros.

β-galatosidasa Enzima bacteriana codificada por el gen *lacZ* que convierte a la lactosa en galactosa y glucosa.

biblioteca de DNA clonado Colección de moléculas clonadas de DNA que representan a todo el genoma de un individuo o parte de él.

biblioteca de cDNA Una colección de secuencias de cDNA clonadas.

biodiversidad La diversidad genética presente en poblaciones y especies de animales y vegetales.

biometría La aplicación de la estadística y de los métodos estadísticos a problemas biológicos.

biotecnología Procesos comerciales y/o industriales que utilizan organismos o productos biológicos.

bivalentes Cromosomas homólogos en sinapsis en la primera profase de la meiosis.

BrdU (5-bromodesoxiuridina) Análogo de la timidina mutagénicamente activo en el que un átomo de bromo reemplaza el grupo metilo en posición 5′ de la timina; también abreviadamente BUdR.

cadena líder Durante la replicación del DNA, la cadena sintetizada de manera continua de 5′ a 3′ hacia la horquilla de replicación.

cadena retrasada En la replicación del DNA, la cadena que se sintetiza de manera discontinua, de 5′ a 3′ desde la horquilla de replicación. Cada pequeño fragmento de DNA sintetizado de esta manera se denomina fragmento de Okazaki.

caja CAAT Secuencia de DNA muy conservada que se encuentra en la región promotora no traducida de los genes de eucariotas. Esta secuencia es reconocida por factores de transcripción.

caja de Pribnow Secuencia de 6 pb situada a 5′ del inicio de la transcripción de los genes procariotas, a la que se une la subunidad σ de la polimerasa del RNA. La secuencia consenso de esta caja es TATAAT.

caja Goldberg-Hogness Secuencia nucleotídica corta situada a 20-30 pb corriente arriba del sitio de iniciación de los genes eucariotas a la que se une la polimerasa II del RNA. La secuencia consenso es TATAAAA. También se conoce como caja TATA.

caja homeótica Secuencia de unos 180 nucleótidos que codifica una secuencia de 60 aminoácidos denominada dominio homeótico, que es parte de una proteína de unión a DNA que actúa como un factor de transcripción.

caja TATA Véase *caja de Goldberg-Hogness*.
calva Área clara en un césped bacteriano opaco, ocasionada por el crecimiento y reproducción de fagos
cambio tautomérico Isomerización reversible de una molécula ocasionada por un cambio en la localización de un átomo de hidrógeno. En los ácidos nucleicos, los cambios tautoméricos en las bases de los nucleótidos pueden causar cambios en otras bases durante la replicación y son una fuente de mutaciones.
CAP Proteína activadora por catabolito; es una proteína que se une al cAMP y que regula la activación de los operones inducibles.
capa de aleurona En las semillas, la capa más externa del endospermo.
carácter Atributo fenotípico observable de un organismo. Cualquier variación fenotípica detectable de un carácter hereditario dado.
carácter complejo Carácter cuyo fenotipo está determinado por la interacción de genes múltiples y factores ambientales.
caracter falciforme Fenotipo mostrado por los individuos heterozigotos para el gen de la anemia falciforme.
carácter familiar Carácter que se transmite y se expresa a través de los miembros de una familia.
carcinógeno Agente físico o químico que provoca el cáncer.
carga genética Número promedio de genes letales recesivos que lleva en heterozigosis un individuo de una población. También se denomina lastre genético.
cariocinesis Proceso de división nuclear.
cariotipo Complemento cromosómico de una célula o de un individuo. A menudo se utiliza para referirse a la disposición de los cromosomas metafásicos en una secuencia de acuerdo con su longitud y la posición del centrómero.
catabolismo Una reacción metabólica en la que moléculas complejas son degradas a formas más simples, a menudo acompañado de liberación de energía.
cDNA DNA sintetizado a partir de un molde de RNA por la enzima retrotranscriptasa.
cebador En los ácidos nucleicos, fragmento corto de RNA o de DNA de cadena sencilla, necesario para el funcionamiento de las polimerasas.
célula F^- Célula bacteriana que no tiene el factor de fertilidad y que actúa como receptora en la conjugación bacteriana.
célula F^+ Célula bacteriana que tiene el factor de fertilidad y que actúa como donante en la conjugación bacteriana.
células somáticas Todas las células de un organismo distintas de las células germinales o gametos.
CEN En levaduras, fragmentos de DNA cromosómico, de unos 120 pb de longitud, que cuando se insertan en plásmidos les confieren la capacidad de segregar en la mitosis. Estos segmentos contienen al menos tres tipos de secuencias asociadas a las funciones centroméricas.
centímetro (cm) Unidad de longitud igual a 10^{-2} metros.
centimorgan (cM) Unidad de distancia entre genes en los cromosomas. Un centimorgan equivale a un 1 por ciento de entrecruzamiento entre dos genes.
centrifugación en gradiente de densidad Método de separación de mezclas de macromoléculas que utiliza fuerzas centrífugas y solventes de densidad variable. En la centrifugación por equilibrio en gradiente de densidad utilizando cloruro de cesio, la solución de cesio establece un gradiente por la influencia del campo centrífugo, y una mezcla de macromoléculas, como del DNA, sedimenta en el gradiente hasta que la densidad del solvente es igual a la de la macromolécula, separándolas por diferencias de densidad.
centriolo Orgánulo citoplásmico compuesto por nueve grupos de microtúbulos, en general dispuestos en tripletes. Los centriolos funcionan generando los cilios y flagelos y sirven como focos para las fibras del huso en la división celular.
centrómero Región especializada del cromosoma a la que permanecen unidas las cromátidas hermanas después de la replicación y el lugar en donde las fibras del huso se enganchan durante la división celular. La localización del centrómero determina la forma del cromosoma durante la anafase de la división celular. También se conoce como constricción primaria.
centrosoma Región del citoplasma en donde se encuentran un par de centriolos.
cepa Grupo de individuos con antecesores comunes que tienen características fisiológicas o morfológicas de interés para su estudio genético o para la mejora.
ciclinas Un tipo de proteínas que se encuentran en las células de los eucariotas, que se sintetizan y degradan en sintonía con el ciclo celular y regulan el paso a través de las fases del ciclo.
ciclo celular Conjunto de las fases de crecimiento de un tipo celular individual; se divide en G1, S (síntesis del DNA), G2 y M (Mitosis).
ciclo de expansión-colapso Periodo de crecimiento poblacional rápido seguido de una reducción drástica del tamaño poblacional.
cinetocoro Estructura fibrosa con un tamaño de unos 400 nm, localizada dentro del centrómero. Parece que es el lugar en donde se unen los microtúbulos durante la división.
cistrón Porción de una molécula de DNA que codifica una sola cadena polipeptídica; definida por análisis genético como una región en la que dos mutaciones no pueden complementarse.
citocinesis La división o separación del citoplasma en la mitosis o en la meiosis.
citoesqueleto Conjunto interno de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios que confieren forma y capacidad de movimiento a la célula eucariota.
citogenética Rama de la Biología en la que se utilizan técnicas citológicas y genéticas para estudiar la herencia.
clina Gradiente de genotipos o fenotipos distribuidos a lo largo de una región geográfica.
clon Moléculas, células u organismos genéticamente idénticos derivados de un solo ancestro por métodos asexuales o parasexuales, tales como un segmento de DNA que se ha insertado enzimáticamente en un plásmido o en el cromosoma de un fago o de una bacteria y que se replica para formar muchas copias.
cloroplasto Orgánulo citoplásmico autorreplicativo que contiene clorofila. Es el sitio donde se realiza la fotosíntesis.
código Véase *código genético*.
código degenerado Término utilizado para describir el código genético, en el que un aminoácido determinado puede estar representado por más de un codón. Por ejemplo, algunos aminoácidos (leucina) tienen seis codones, mientras que otros (isoleucina) tienen tres.
código genético Tripletes de nucleótidos que codifican los 20 aminoácidos o la iniciación o la terminación de la cadena.
código solapante Código genético propuesto inicialmente por George Gamow en el que cualquier nucleótido dado está compartido por tres codones adyacentes.
código universal Suposición de que todas las formas de vida utilizan el mismo código genético. En general, es cierto; las mitocondrias, los ciliados y los micoplasmas presentan algunas excepciones.
codominancia Situación en la que los efectos fenotípicos de los alelos de un gen se expresan total y simultáneamente en el heterozigoto.

codón Triplete de nucleótidos que especifica o codifica para un aminoácido. Sesenta y un codones especifican los aminoácidos codificados por las proteínas y tres codones, llamados de terminación, señalan la finalización del crecimiento de la cadena polipeptídica.

codón ámbar Codón UAG, que no codifica un aminoácido sino la terminación de la cadena.

codón de iniciación Triplete de nucleótidos (AUG) en una molécula de mRNA que codifica la inserción del aminoácido metionina como primer aminoácido de una cadena polipeptídica.

codón sin sentido Triplete nucleotídico de una molécula de mRNA que señala la terminación de la traducción. Se conocen tres codones sin sentido: UGA, UAG y UAA.

coeficiente de coincidencia Proporción del número observado de dobles recombinantes respecto del número esperado.

coeficiente de consanguinidad Probabilidad de que dos alelos presentes en un zigoto sean descendientes de un antecesor común.

coeficiente de migración Expresión de la proporción de genes migrantes que se introducen en la población por generación.

coeficiente de sedimentación Véase *unidad del coeficiente de Svedberg*.

coeficiente de selección (*s*) Medida cuantitativa de la eficacia biológica relativa de un genotipo respecto de otro. Medida de la desventaja reproductiva de un genotipo dado en una población. Por ejemplo, si del genotipo *aa* sólo sobreviven 99 de cada 100 individuos, entonces el coeficiente de selección es 0,01.

colchicina Alcaloide que inhibe la formación del huso en la división celular. Utilizado en la preparación de cariotipos para coleccionar grandes poblaciones de células inhibidas en metafase de la mitosis

colinearidad Relación lineal entre la secuencia nucleotídica de un gen (o del RNA trancrito de él) y el orden de aminoácidos de la cadena polipeptídica especificada por el gen.

colorantes de acridina Un tipo de compuestos orgánicos que se unen al DNA y que se intercalan en su estructura de doble cadena, produciendo interrupciones locales del emparejamiento de bases. Estas interrupciones resultan en adiciones o deleciones en la siguiente ronda de replicación.

compensación de dosis Mecanismo genético que regula los niveles de productos génicos en ciertos loci del cromosoma X de los mamíferos, de tal manera que machos y hembras tienen cantidades iguales de un producto génico. En los mamíferos, esto se realiza mediante la inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X.

competencia En bacterias, estado transitorio durante el que la célula puede unir e introducir en su interior moléculas exógenas de DNA, haciendo posible la transformación.

complejidad Número total de nucleótidos o de pares de nucleótidos en una población de moléculas de ácidos nucleicos determinada por cinética de reasociación.

complejo sinaptinémico (SC) Orgánulo que consta de un eje tripartito nucleoptoteico que se forma entre los cromosomas homólogos emparejados en el paquiteno de la primera división meiótica.

complementariedad Afinidad química entre bases nitrogenadas como consecuencia de los puentes de hidrógeno. Es responsable del emparejamiento de bases entre las cadenas de la doble hélice del DNA.

concatémero Cadena o serie lineal de subunidades unidas entre sí. El proceso de formación de un concatémero se denomina concatenación (p.e., unidades múltiples del genoma de un fago producidas durante la replicación).

concordancia Pares o grupos de individuos idénticos en sus fenotipos. En estudios de gemelos, situación en la que ambos gemelos presentan o no el carácter que se investiga.

configuración en *cis* Disposición de dos genes o de dos sitios mutantes en un gen en el mismo homólogo, como

$$\frac{a^1 \quad a^2}{+ \quad +}$$

de tal manera que contrasta con la ordenación *trans*, en donde los alelos mutantes están localizados en homólogos opuestos.

configuración en *trans* Ordenación de dos sitios mutantes en los homólogos opuestos, tal como

$$\frac{a^1 \quad +}{+ \quad a^2}$$

que contrasta con la ordenación en *cis*, en la que los dos sitios mutantes están localizados en el mismo homólogo.

conformación emparejada Véase *configuración en cis*.

conjugación Unión temporal de dos organismos celulares para la transferencia sexual de material genético.

consanguíneo Relacionado por un antecesor común de unas pocas generaciones anteriores

consanguinidad Cruce entre organismos íntimamente emparentados.

consejo genético Análisis del riesgo de defectos genéticos en una familia y la presentación de las opciones disponibles para evitar o reducir los posibles riesgos.

conversión génica Proceso de recombinación no recíproca mediante el cual un alelo de un heterozigoto se convierte en el alelo correspondiente.

corpúsculo de Barr Masa nuclear que se tiñe fuertemente, observada en los núcleos somáticas de hembras de mamíferos. Descubierto por Murray Barr, este corpúsculo es un cromosoma X inactivado.

corpúsculo de cromatina sexual Véase *corpúsculo de Barr*

corrección de pruebas Mecanismo molecular para corregir errores de la replicación, de la transcripción y de la traducción. También se conoce como editado.

corte y empalme alternativo Generación de moléculas proteicas diferentes a partir del mismo mRNA transcrito por cambio en el número y orden de los exones en el mRNA maduro.

cósmido Vector diseñado para permitir la clonación de segmentos largos de DNA foráneo. Los cósmidos son híbridos formados por sitios *cos* del fago λ insertados en un plásmido. Durante la clonación, las moléculas de DNA recombinante se empaquetan en la cubierta proteica del fago y, después de infectar células bacterianas, la molécula recombinante se replica y puede mantenerse como un plásmido.

cremallera de leucina Motivo estructural de una proteína de unión a DNA que se caracteriza por un segmento de residuos leucina separados por siete residuos aminoacídicos, con regiones adyacentes de aminoácidos cargados positivamente. Las cremalleras de leucina de dos polipéptidos pueden interaccionar para formar un dímero que se une a DNA.

cristalografía de rayos X Técnica para determinar la estructura tridimensional de moléculas mediante patrones de difracción producidos por la dispersión de los rayos X por los cristales de la molécula que se está analizando.

cromátida Una de las unidades longitudinales de un cromosoma duplicado; está unida a su cromátida hermana por el centrómero.

cromatina Término utilizado para describir el complejo DNA, RNA y proteínas histonas y no histonas que constituyen los cromosomas desespiralizados, característica del núcleo interfásico de los eucariotas.
cromatografía Técnica de separación de una mezcla de moléculas solubilizadas por su migración diferencial en un sustrato.
cromocentro Agregado de centrómeros y elementos heterocromáticos de los cromosomas politénicos.
cromómero Región enrollada como una bolita, en un cromosoma, visible más fácilmente en la división celular. El alineamiento de los cromómeros en los cromosomas politénicos es responsable de su característico patrón de bandas.
cromosoma En procariotas una o más moléculas de DNA que contienen al genoma; en eucariotas, una molécula de DNA acomplejada con RNA y proteínas para formar una estructura alargada que lleva la información genética dispuesta en una secuencia lineal y visible durante la mitosis y meiosis.
cromosoma acéntrico Cromosoma o fragmento de cromosoma sin centrómero.
cromosoma acrocéntrico Cromosoma con el centrómero localizado muy cerca de un extremo. Los cromosomas humanos 12, 14, 15, 21 y 22 son acrocéntricos.
cromosoma dicéntrico Cromosoma que tiene dos centrómeros.
cromosoma Filadelfia Producto de una translocación recíproca que contiene el brazo corto del cromosoma 9, que lleva el oncogen *C-ABL*, y el brazo largo del cromosoma 22, que lleva el gen *BCR*.
cromosoma metacéntrico Cromosoma con un centrómero localizado equidistante de los extremos, que da lugar a brazos cromosómicos de la misma longitud.
cromosoma politénico Cromosoma que ha sufrido varias rondas de replicación del DNA sin que los cromosomas replicados se separen, formando un grueso cromosoma gigante con los cromómeros alineados, dando lugar a un patrón característico de bandas.
cromosoma sexual Cromosoma implicado en la determinación del sexo, como los X o Y en la especie humana.
cromosoma submetacéntrico Cromosoma con el centrómero situado de tal manera que un brazo del cromosoma es ligeramente más largo que el otro.
cromosoma telocéntrico Cromosoma en el que el centrómero se encuentra en el extremo del cromosoma.
cromosoma X Cromosoma sexual que se encuentra en especies en donde las hembras son el sexo homogamético (XX).
cromosoma Y Cromosoma sexual en especies en donde el macho es el sexo heterogamético.
cromosomas en escobilla Cromosomas meióticos que se caracterizan por lazos laterales extendidos, que alcanzan su máxima extensión en el diploteno. Aunque más intensamente estudiados en anfibios, estas estructuras se encuentran en células en meiosis de organismos desde insectos a la especie humana.
cromosomas homólogos Cromosomas que forman parejas o sufren sinapsis en la meiosis. Cromosomas que son idénticos en cuanto a sus loci génicos y situación del centrómero.
cromosomas W, Z Cromosomas sexuales que se encuentran en especies en donde la hembra es el sexo heterogamético (WZ).
cromosomas X unidos Unión de dos cromosomas X que comparten un único centrómero.
cruce dihíbrido Cruce entre dos caracteres de los que los padres poseen formas diferentes de cada uno (p.e., guisantes amarillos, redondos x verdes, rugosos)
cruce monohíbrido Cruce entre dos individuos implicando sólo un carácter (p.e., *AA* x *aa*)
cruce prueba Cruce de un individuo cuyo genotipo en uno o más loci es desconocido con un individuo que es homozigoto recesivo para los genes en cuestión.
cruce retrogrado Cruce entre un heterozigoto de F_1 y uno de los padres P_1 (o con un organismo idéntico a uno de los padres).
cruce selectivo Cruce no aleatorio entre machos y hembras de una especie. La selección es positiva si los que se aparean tienen el mismo genotipo; la selección es negativa si los que se aparean tienen genotipos distintos
cruces recíprocos Un par de cruces en los que el genotipo de la hembra del primer cruce se encuentra como genotipo del macho del segundo cruce y viceversa.
cuello de botella Fluctuación de la frecuencia alélica que se produce cuando una población sufre una reducción temporal de su tamaño.
cuerpo polar Célula producida en las hembras en la primera o en la segunda división meiótica, que casi no tiene citoplasma como consecuencia de una citocinesis desigual.
chaperón Proteína que regula el plegamiento de un polipéptido dando lugar a una forma funcional tridimensional.
choque térmico Respuesta transitoria tras la exposición de células o de organismos a temperaturas elevadas. La respuesta implica la activación de un pequeño número de loci, la inactivación de loci anteriormente activos y la traducción selectiva de mRNA de choque térmico. Parece que es un fenómeno casi universal observado en organismos que van desde las bacterias hasta la especie humana.
dalton (Da) Unidad de masa que equivale a la del átomo de hidrógeno, que es de $1{,}67 \times 10^{-24}$ gramos. Unidad utilizada para designar pesos moleculares.
de novo Que se origina de nuevo; sintetizado a partir de precursores menos complejos en vez de haberse producido por modificación de una molécula existente.
dedo de zinc Dominio de unión a DNA de una proteína que tiene un patrón característico de residuos de cisteína y de histidina que se acomplejan a iones de zinc, disponiendo a los aminoácidos intermedios en series de lazos o de dedos.
deficiencia Mutación cromosómica que implica la pérdida o deleción de material cromosómico.
deleción Véae *deficiencia*
demo Población local con apareamiento libre.
densidad de flotación Propiedad de las partículas (y de las moléculas) que depende de su densidad real, determinada por su volumen específico parcial y por el grado de hidratación. Proporciona la base para la separación de moléculas o de partículas mediante gradientes de densidad.
depresión consanguínea Disminución de la viabilidad, del vigor o del crecimiento en la descendencia después de varias generaciones de consanguinidad.
depresión no consanguínea Reducción de la eficacia en los descendientes de un cruce entre padres genéticamente distintos. Se cree que es el resultado de una disminución de la adaptación a condiciones ambientales locales.
deriva genética Variación aleatoria de las frecuencia alélicas de generación en generación, observándose más a menudo en poblaciones pequeñas.
dermatoglifo Estudio de los pliegues superficiales de la piel, especialmente de manos y pies.

desoxirribonucleasa Tipo de enzima que rompe el DNA en fragmentos de oligonucleótidos, introduciendo cortes de cadena sencilla en la doble hélice.

desoxirribosa Azúcar de cinco carbonos asociado a los desoxirribonucleótidos del DNA.

desviación típica Medida cuantitativa de la cantidad de variación en una muestra de las medidas de una población.

determinación Suceso de regulación que establece un patrón específico de actividad génica y de destino de desarrollo en una célula dada.

diacinesis Estadio final de la profase I de la meiosis en la que los cromosomas se espiralizan densamente, se compactan y se desplazan hacia la periferia del núcleo.

diada Productos de la separación o disyunción de la tétrada en la primera profase meiótica. Consta de dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero.

dideoxinucleótido Nucleótido con una azúcar desoxiribosa que carece del grupo hidroxilo en 3′. Detiene el alargamiento de la cadena cuando se incorpora en un polinucleótido en crecimiento; utilizado en el método de Sanger para la secuenciación del DNA.

diferenciación Proceso de cambios complejos mediante los que las células y los tejidos alcanzan su estructura adulta y su capacidad funcional.

dímero de timina Par de bases de timina adyacentes en una misma cadena polinucleotídica entre las que se han formado enlaces químicos entre los átomos de carbono 5 y 6. Esta lesión, generalmente resultado de daño causado por la exposición a luz ultravioleta, inhibe la replicación del DNA a menos que sea reparada por el sistema enzimático adecuado.

diploide Situación en la que cada cromosoma forma parejas; que tiene dos de cada cromosoma.

diploide parcial Véase *merozigoto*.

diploteno Un estadio de la profase de la meiosis inmediatamente después del paquiteno. En el diploteno, un par de cromátidas hermanas comienza a separarse, quedando visibles los quiasmas. Estos se desplazan lateralmente hacia los extremos de las cromátidas (terminalización).

disco imaginal Grupo discreto de células reservado durante la embriogénesis de los insectos holometábolos, que está determinado a formar las partes corporales externas del adulto.

discordancia En estudio de gemelos, situación en donde un gemelo expresa un carácter pero el otro no lo muestra.

distribución normal Función de probabilidad que se aproxima a la distribución de variables aleatorias. La curva normal, también conocida como curva en campana o de Gauss, es la grafica que representa la distribución normal.

distrofia muscular de Duchenne Trastorno genético recesivo ligado al X, ocasionado por una mutación en el gen para la distrofina, una proteína que se encuentra en las células musculares. Los varones afectados muestran una debilidad y desgaste progresivo del tejido muscular. La muerte resulta a edad de 20 años por infecciones respiratorias o fallo cardíaco.

distrofina Proteína que se une en la parte interior de la membrana plasmática de la célula muscular, estabilizando la membrana durante la contracción. Las mutaciones en el gen que codifica la distrofina dan ligar a las distrofias musculares de Duchenne y Becker. Véase *distrofia muscular de Duchenne*.

disyunción Separación de los cromosomas en la anafase de la división celular.

división ecuacional División longitudinal de cada cromosoma en dos mitades que se distribuyen en los dos núcleos hijos. La división de los cromosomas en la mitosis es un ejemplo de división ecuacional.

división reduccional División del cromosoma que reduce a la mitad el número diploide de cromosomas. La primera división de la meiosis es reduccional.

DNA Véase *ácido desoxirribonucleico*.

DNA-A Forma alternativa de estructura helicoidal dextrógira del DNA en la que la hélice está enrollada de manera más compacta, con 11 pares de bases por vuelta completa de la hélice. En esta forma, las bases de la hélice están desplazadas lateralmente e inclinadas en relación al eje longitudinal. No se sabe si esta formación tiene significado biológico.

DNA desnaturalizado Moléculas de DNA que se han separado en cadenas sencillas.

DNA espaciador Secuencias de DNA que se encuentran entre genes, normalmente segmentos de DNA repetitivo.

DNA girasa Una de las topoisomerasas que actúa durante la replicación del DNA para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento. La DNA girasa produce cortes de doble cadena y después los une.

DNA ligasa Enzima que forma enlaces covalentes entre el extremo 5′ de una cadena polinucleotídica y el extremo 3′ de otra cadena polinucleotídica. También se denomina enzima de unión de polinucleótidos.

DNA mitocondrial (mtDNA) DNA circular, de doble cadena, autoreplicativo, que se encuentra en las mitocondrias. El mtDNA codifica RNA ribosómicos mitocondriales, RNA de transferencia y proteínas utilizadas en funciones de la respiración oxidativa de los orgánulos.

DNA polimerasa Enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de desoxirribonucleótidos y de una molécula molde de DNA.

DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) Método de PCR que utiliza cebadores aleatorios de unos 10 nucleótidos para amplificar secuencia de DNA desconocidas

DNA recombinante Molécula de DNA formada por la unión de dos moléculas heterólogas. Generalmente se aplica a moléculas producidas por ligación *in vitro* de DNA proveniente de dos organismos diferentes.

DNA satélite DNA que forma una banda minoritaria cuando se centrifuga DNA genómico en un gradiente de una sal de cesio. En general, este DNA consta de secuencias cortas repetidas muchas veces en el genoma.

DNA superenrollado Tipo de estructura del DNA en la que la hélice se enrolla sobre sí misma. Estas estructuras pueden existir en formas estables sólo cuando los extremos del DNA no están libres, como en una molécula de DNA circular cerrada covalentemente.

DNA único Secuencias de DNA que están presentes sólo una vez por genoma.

DNA-Z Estructura alternativa del DNA en la que dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas forman una doble hélice levógira. Se ha demostrado que el DNA-Z está presente en los cromosomas, y podría tener algún papel en la regulación de la expresión génica.

DNasa Desoxirribonucleasa; enzima que degrada o rompe el DNA en fragmentos o en sus nucleótidos constitutivos.

doble hélice Modelo de estructura del DNA propuesto por James Watson y Francis Crick, que implica dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas unidas por puentes de hidrógeno, enrolladas en una confi-

guración helicoidal dextrógira, con 10 pares de bases por vuelta de la doble hélice. A menudo se denomina DNA-B.

dogma central Concepto de que el flujo de información progresa del DNA al RNA y a las proteínas. Aunque se conocen excepciones, esta idea es central para entender la función génica.

dominancia La expresión de un carácter en el heterozigoto.

dominancia incompleta Expresión del fenotipo heterozigoto que es distinto, y a menudo intermedio, del fenotipo de los dos padres.

dominancia parcial Véase *dominancia incompleta*.

duplicación Aberración cromosómica en la que un segmento de un cromosoma se repite.

duplicación génica Suceso en la replicación que da lugar a la producción de una repetición en tandem de una secuencia génica.

edición de RNA Alteración de la secuencia nucleotídica de una molécula de mRNA después de la transcripción y antes de la traducción. Hay dos tipos principales de edición: la edición por sustitución, que cambia nucleótidos individuales, y la edición por inserción/deleción, en la que se añaden o se delecionan nucleótidos.

efecto alostérico Cambio en la conformación del lugar activo de una proteína inducido por la interacción con una molécula efectora.

efecto de posición Cambio de la expresión de un gen asociado al cambio de la localización del gen en el genoma.

efecto fundador Forma de deriva genética. El establecimiento de una población por un pequeño número de individuos cuyos genotipos llevan sólo una parte de los diferentes tipos de alelos de la población paterna.

efecto materno Efectos fenotípicos en los descendientes producidos por el genoma materno. Los factores que se transmiten a través del citoplasma del óvulo producen un efecto fenotípico en la descendencia.

eficacia biológica Medida de la supervivencia relativa y del éxito reproductivo de un individuo o genotipo dado..

eficacia darwiniana Véase *eficacia biológica*

electroforesis Técnica utilizada para separar una mezcla de moléculas por su migración diferencial en una fase estacionaria (como un gel) sometida a un campo eléctrico.

elemento IS Segmento de DNA móvil que se transpone a cualquier lugar del genoma.

elemento P Elemento de DNA transponible encontrado en *Drosophila*, responsable de la disgénesis híbrida.

elemento transponible Segmento de DNA que se transloca a otros sitios en el genoma, de manera esencialmente independiente de la homología de secuencia. Normalmente, estos elementos están flanqueados por repeticiones cortas e invertidas de 20 a 40 pares de bases en cada extremo. La inserción dentro de un gen estructural puede producir un fenotipo mutante. La inserción y la escisión de los elementos transponibles dependen de dos enzimas, la transposasa y la resolvasa. Tales elementos se han identificado en procariotas y en eucariotas.

elementos interdispersos cortos (SINES) Secuencias repetitivas que se encuentran en el genoma de los organismos superiores, como la secuencia *Alu* de 300 pares de bases..

elementos interdispersos largos (LINES) Son secuencias repetitivas que se encuentran en el genoma de los organismos superiores, como las secuencias L1 de 6kb que se encuentran en el genoma de los primates.

emparejamiento somático Emparejamiento de los cromosomas homólogos en una célula somática.

encefalopatía espongiforme bovina Una enfermedad mortal degenerativa del cerebro en el ganado ocasionada por infección de priones. Esta infección es transmisible a humanos y otros animales. También se conoce como el mal de las vacas locas.

endocitosis Inclusión por una célula de fluidos, macromoléculas o partículas por pinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptores.

endomitosis Replicación cromosómica que no va acompañada por división nuclear o citoplásmica.

endonucleasa Enzima que hidroliza los enlaces fosfodiéster internos de una cadena polinucleotídica o de una molécula de ácido nucleico.

endonucleasa de restricción Nucleasa que reconoce secuencias nucleotídicas específicas en una molécula de DNA, y que corta al DNA por ese sitio o que le hace una muesca. Derivados de una serie de microorganismos, las enzimas que cortan ambas cadenas de DNA se utilizan en la construcción de moléculas de DNA recombinante.

endopoliploidía Aumento de las dotaciones cromosómicas en los núcleos somáticos que resultan de la replicación por endomitosis

enfermedad autoinmune Producción de anticuerpos que resulta de la respuesta inmunitaria a una molécula, célula o tejido propios. Dicha respuesta resulta de la incapacidad del sistema inmunitario para distinguir lo propio de lo foráneo. Se considera que enfermedades como la artritis, la escleroderma, el lupus eritematoso sistémico y la diabetes de aparición juvenil son ejemplos de enfermedades autoinmunes.

enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) Enfermedad degenerativa progresiva y mortal del cerebro y sistema nervioso ocasionada por mutaciones en el gen de la proteína prión del cromosoma 20 que produce formas aberrantes de la proteína codificada. Se hereda como carácter dominante autosómico.

enfermedad del injerto contra el huésped (GVDH) En transplantes, reacción de células inmunológicamente competentes del donante contra los antígenos presentes en las células del huésped. En transplantes de médula ósea en humanos, a menudo es una situación mortal.

enlace covalente Unión química no iónica formada por electrones compartidos.

enlace fosfodiéster En los ácidos nucleicos, enlace covalente entre un grupo fosfato y el nucleótido adyacente, desde el carbono 5′ de una pentosa (ribosa o desoxirribosa) al carbono 3′ de la pentosa del nucleótido vecino. Los enlaces fosfodiéster forman la columna vertebral de las moléculas de ácido nucleico.

enlace peptídico Enlace covalente entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido.

ensayo de Ames Ensayo desarrollado por Bruce Ames para detectar compuestos mutagénicos y carcinogénicos utilizando la reversión a la independencia de histidina en la bacteria *Salmonella typhimurium*.

entrecruzamiento Intercambio de material cromosómico (partes de los brazos cromosómicos) entre cromosomas homólogos por rotura y reunión. El intercambio de material entre cromátidas no hermanas durante la meiosis es la base de la recombinación genética.

entrecruzamiento desigual Entrecruzamiento entre dos homólogos mal alineados que da lugar a que un homólogo tenga dos copias de un segmento y el otro carezca de dicha segmento.

entrecruzamiento doble Dos sucesos separados de rotura e intercambio entre cromosomas que se producen en la misma tétrada.

enzima Proteína o complejo proteico que cataliza una reacción bioquímica específica.

enzima fotorreactivadora (PRE) Exonucleasa que cataliza la escisión, activada por la luz, de los dímeros de timina del DNA inducidos por radiación ultravioleta.
epigénesis La idea de que un organismo se desarrolla por la aparición y crecimiento de estructuras nuevas. Opuesta al preformismo, que mantiene que el desarrollo consiste en el crecimiento de estructuras que ya estaban presente el huevo.
episoma Elemento genético circular de las bacterias que puede replicarse independientemente del cromosoma bacteriano o integrarse y replicarse como parte del cromosoma.
epistasis Interacción no recíproca entre genes de tal manera que un gen interfiere o evita la expresión de otro gen. Por ejemplo, en *Drosophila*, el gen recesivo *eyeless* en homozigosis impide la expresión de los genes para el color de los ojos.
epítopo Porción de una macromolécula o de una célula que produce una respuesta de anticuerpos; determinante antigénico. Una molécula compleja o una célula pueden contener varios sitios de éstos.
equilibrio genético Mantenimiento de las frecuencias alélicas durante generaciones sucesivas. Situación en la que las frecuencias alélicas ni aumentan ni disminuyen.
equilibrio interrumpido Patrón en el registro fósil de largos periodos de estabilidad de las especies y breves periodo puntuales de divergencia de especies.
erosión genética Pérdida de la diversidad genética en una población o especie.
error congénito del metabolismo Trastorno bioquímico controlado genéticamente, normalmente una enzima defectuosa que produce un síndrome clínico.
error típico Medida cuantitativa de la cantidad de variación de la media de una muestra de una población.
esferoplasto Véase *protoplasto*
especiación alopátrica Proceso de especiación asociado con aislamiento geográfico.
especiación cuántica Formación de una nueva especie en una sola o en pocas generaciones por combinación de selección y deriva.
especiación Proceso mediante el que aparecen nuevas especies de vegetales y animales.
especiación simpátrica Proceso de especiación que implica a poblaciones que habitan, al menos en parte, en la misma área geográfica.
especie Grupo de individuos que real o potencialmente puede cruzarse y que están reproductívamente aislados de otros grupos similares.
especies gemelas Especies que son casi idénticas morfológicamente, pero que están aisladas reproductivamente entre si.
espora Célula o cuerpo unicelular envuelto por una cubierta protectora producida por algunas bacterias, vegetales e invertebrados; es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables; puede dar lugar a un nuevo individuo por germinación. En los vegetales, las esporas son los productos haploides de la meiosis.
estéril Situación de ser incapaz de reproducirse. También, libre de microorganismos contaminantes.
estructura cuaternaria de las proteínas Tipos y modos de interacción entre dos o más cadenas polipeptídicas en una molécula proteica.
estructura de Holliday Intermediario de la recombinación bidireccional del DNA que en el microscopio electrónico de transmisión se ve como una estructura en forma de X.
estructura de lazada Estructura formada por un intrón mediante un enlace 5′-3′ durante el procesado y eliminación de dicho intrón del mRNA.
estructura de solenoide Uno de los niveles de la estructura cromosómica de los eucariotas generado por el superenrollamiento de los nucleosomas.
estructura genética fina Análisis intragénico por recombinación que proporciona información de mapa a nivel de nucleótidos individuales.
estructura primaria de las proteínas La secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.
estructura secundaria de las proteínas Forma de hélice a o de hoja plegada β de una molécula proteica ocasionada por la formación de puentes de hidrógeno entre aminoácidos.
estructura terciaria de las proteínas Estructura tridimensional de una cadena polipeptídica ocasionada por plegamientos sobre sí misma.
estructura theta (θ) Fase intermedia de la replicación bidireccional de las moléculas de DNA circular. Aproximadamente hacia la mitad del ciclo de replicación, esta fase se parece a la letra griega theta.
eucariotas Organismos que tienen núcleo y orgánulos membranosos y cuyas células presentan mitosis y meiosis.
eucromatina Cromatina o región cromosómica que se tiñe débilmente y que está relativamente desespiralizada en la interfase del ciclo celular. Las regiones eucromáticas contienen la mayoría de los genes estructurales.
eufenesia Intervención médica o genética para reducir el impacto de los genotipos defectuosos.
eugenesia Mejora de la especie humana por cruzamientos selectivos. La eugenesia positiva se refiere a la promoción de cruzamientos entre aquellos que tienen genes favorables y la eugenesia negativa se refiere a la disuasión del cruzamiento entre aquellos que tienen caracteres no deseables.
euploide Poliploide con un número de cromosomas que es exactamente múltiplo de una dotación cromosómica básica.
evolución Origen de vegetales y animales a partir de tipos preexistentes. Descendencia con modificaciones.
evolución filética Transformación gradual de una especie en otra con el tiempo; evolución vertical.
exclusión alélica En células plasmáticas heterozigotas para un gen de las inmunoglobulinas, la acción selectiva de un solo alelo.
exón Segmentos de DNA de un gen que se transcriben y se traducen a proteínas.
exonucleasa Enzima que rompe las moléculas de ácido nucleico cortando los enlaces fosfodiéster en el extremo 3′ o 5′ de los nucleótidos terminales.
experimento de la perdigonada Clonación de fragmentos aleatorios de DNA en un vehículo, como un plásmido o un fago, generalmente para producir un banco o una biblioteca de clones de la que se puedan seleccionar clones de interés específico.
expresividad Grado o rango en el que se expresa un fenotipo para un carácter dado.
extracto libre de células Preparación de la fracción celular soluble, hecha lisando las células y eliminando la materia particulada, como el núcleo, las membranas y los orgánulos. A menudo se utiliza para llevar a cabo la síntesis de proteínas mediante la adición de moléculas de mRNA exógenas específicas.
extremo C Extremo de un polipéptido cuyo último aminoácido tiene un grupo carboxilo libre. Por convención, la fórmula estructural de los polipéptidos se escribe con el extremo C a la derecha.
extremo N Extremo de un polipéptido que tiene libre el grupo amino del primer aminoácido. Por convención, la fórmula estructural de los polipéptidos se escribe con el extremo N a la izquierda.

factor de fertilidad Véase *factor F*.
factor de transferencia de resistencia (RTF) Componente de un plásmido R que confiere la capacidad de transferencia de célula a célula del plásmido R por conjugación.
factor F Episoma de las células bacterianas que les confiere la capacidad para actuar como donantes en la conjugación (también, *factor de fertilidad*).
factor F′ Factor de fertilidad que lleva una parte del cromosoma de la bacteria.
factor R (plásmido R) Plásmido bacteriano que lleva genes para la resistencia a antibióticos. Muchos plásmidos R tienen dos componentes: un componente r que lleva genes para la resistencia a los antibióticos y el factor de transferencia de la resistencia (RTF)
factor Rh Sistema antigénico descrito en el mono rhesus. Los individuos recesivos *r/r* no producen antígenos y son Rh negativo, mientras que los individuos *R/R* y *R/r* tienen antígenos Rh en la superficie de sus glóbulos rojos y se clasifican como Rh positivo.
factor sigma (σ) Subunidad polipeptídica de la polimerasa del RNA que reconoce el sitio de unión para la iniciación de la transcripción.
fago Véase *bacteriófago*.
fago atenuado Bacteriófago que se puede convertir en profago y conferir el estado de lisogenia a la bacteria huésped.
fago mu (μ) Grupo de fagos en los que el material genético se comporta como una secuencia de inserción; capaz de inserción, escisión, transposición, inactivación de genes del huésped e inducción de reordenaciones cromosómicas. Véase *bacteriófago μ*.
fago virulento Bacteriófago que infecta y lisa a las bacterias.
fagos charon Grupo de fagos lambda genéticamente modificados diseñados para ser utilizados como vectores en la clonación de DNA exógeno. Se denominan así por el barquero de la mitología griega (Caronte) que llevaba las almas de los muertos atravesando la laguna Estigia.
familia multigénica Grupo de genes que descienden de un ancestro común por duplicación y posterior divergencia del ancestro común. Los genes de la globina son un ejemplo de familia multigénica.
fase lítica Situación en la que un bacteriófago atenuado pierde su estado integrado en el cromosoma huésped (queda inducido), se replica y lisa a la bacteria.
fenilcetonuria (PKU) Enfermedad hereditaria humana asociada a la incapacidad de metabolizar el aminoácido fenilalanina. La forma más común está causada por la carencia de la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa.
fenotipo Las propiedades observables de un organismo controladas genéticamente
fenotipo Bombay Una variante rara del sistema AB0 en la que los individuos afectados no tienen antígenos A o B y así parece que sean del tipo 0, aun cuando su genotipo puede llevar alelos que no se expresan de los antígenos A y/o B.
fetoproteína alfa (AFP) Glicoproteína de 70 kDa sintetizada durante el desarrollo embrionario por la membrana vitelina. Altos niveles de esta proteína en el fluido amniótico se asocian a defectos en el tubo neural, como la espina bífida; niveles inferiores a los normales pueden estar asociados con el síndrome de Down.
fibras del huso Fibrillas citoplásmicas formadas en la división celular, implicadas en la separación de las cromátidas en la anafase y en su desplazamiento hacia los polos opuestos de la célula.
fijación En genética de poblaciones, situación en la que todos los miembros de una población son homozigotos para un alelo dado.
FISH Véase hibridación *in situ* fluorescente.
flujo génico Intercambio gradual de genes entre dos poblaciones; se produce por la dispersión de gametos o por la migración de individuos.
f-Met Véase *formilmetionina*.
fondo genético Todos los genes que lleva un genoma distintos del que se está estudiando.
footprinting Técnica para identificar una secuencia de DNA que se une a una proteína particular, basada en la idea que los enlaces fosfodiéster de la región cubierta por la proteína están protegidos de la digestión por desoxirribonucleasas.
forma replicativa (RF) Moléculas de ácido nucleico de doble cadena presente como intermediarios durante la reproducción de ciertos virus.
formilmetionina (f-Met) Molécula derivada del aminoácido metionina al que se ha unido un grupo formilo en su grupo amino terminal. Es el primer aminoácido que se inserta en todos los polipéptidos bacterianos. También se conoce como *N*-formil metionina.
fragmento de Okazaki Cadenas pequeñas y discontinuas de DNA producidas en la cadena retrasada durante la síntesis de DNA.
frecuencia alélica Medida de la proporción de individuos de una población que llevan un alelo dado.
frecuencia génica Porcentaje de alelos de un tipo dado en una población.
funciones de mapa Distancias de mapa estimadas por recombinación, cuando la frecuencia de recombinación excede del 15 al 20 por ciento, y los recombinantes doble son indetectables.
fusión céntrica Véase *translocación Robertsoniana*
G0 Momento en la fase G1 en el que la célula abandona el ciclo celular y entra en un estado activo metabólicamente, pero sin dividirse.
gameto Célula reproductora especializada con un número de cromosomas haploide.
gameto no recombinante Gameto que no contiene cromosomas que hayan sufrido recombinación.
gameto paterno Véase *gameto no recombinante*.
gameto recombinante Gameto que tiene una nueva combinación de genes producida por entrecruzamiento en la meiosis.
gemelos dizigóticos Gemelos producidos por dos sucesos de fecundación independientes, dos óvulos fecundados independientemente. También se los conoce como gemelos fraternos.
gemelos fraternos Véase *gemelos dizigotos*.
gemelos idénticos Véase *gemelos monozigotos*.
gemelos monozigotos Gemelos producidos por una única fecundación; la primera división del zigoto da lugar a dos células, cada una de las cuales da lugar a un embrión. También se les conoce por gemelos idénticos.
gen Unidad física fundamental de la herencia, cuya existencia se puede confirmar por las variantes alélicas y que ocupa un lugar específico en el cromosoma. Secuencia de DNA que codifica un único polipéptido.
gen estructural Gen que codifica una secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.
gen letal Gen cuya expresión da lugar a la muerte.
gen subletal Mutación que disminuye la viabilidad, con muerte antes de la madurez en menos del 50 por ciento de los individuos que llevan el gen.
gen supresor de tumores Gen que codifica un producto que normalmente funciona suprimiendo la división celular. La mutación

en los genes supresores de tumores da lugar a la activación de la división celular y a la formación del tumor.
genealogía En genética humana, esquema mostrando las relaciones ancestrales y la transmisión de los caracteres genéticos durante varias generaciones en una familia.
generación F_1 Primera generación filial; la descendencia que resulta del primer cruce en una serie.
generación F_2 Segunda generación filial; la descendencia que resulta del cruce de F_1.
generación filial Véanse *generaciones F_1 y F_2*.
genes aditivos Véase *herencia poligénica*.
genes de la polaridad de los segmentos Genes que regulan el patrón espacial de diferenciación dentro de cada segmento durante el desarrollo de los embriones de *Drosophila*.
genes de la regla par Genes que se expresan en bandas alrededor del embrión en el estadio de blastodermo durante el desarrollo del embrión de *Drosophila*.
genes *gap* Genes que se expresan en dominios contiguos a lo largo del eje antero-posterior del embrión de *Drosophila*, y que regulan el proceso de segmentación en cada dominio.
genes redundantes Secuencias génicas presentes en más de una copia por genoma haploide (por ejemplo, genes ribosómicos)
genética Rama de la Biología que trata de la herencia y de la expresión de los caracteres hereditarios.
genética celular somática La utilización de células somáticas cultivadas para investigar fenómenos genéticos mediante técnicas parasexuales que implica la fusión de células de organismo distintos.
genética de la conservación Rama de la genética que trata de la preservación y mantenimiento de especies silvestres animales y vegetales en sus ambientes naturales.
genética de la transmisión Campo de la genética que trata del mecanismo mediante el que los genes se transfieren de padres a hijos.
genoma La dotación de genes que lleva un individuo
genómica Estudio de los genomas, incluyendo la secuencia nucleotídica, el contenido de genes, su organización y su número.
genotipo Alelo concreto o constitución genética de un organismo; a menudo, la composición alélica de uno o de un número limitado de genes que se está investigando.
ginandromorfo Individuo formado por células con genotipos masculinos o femeninos.
girasa Enzima del tipo de las topoisomerasas. La girasa convierte al DNA circular cerrado en una forma superenrollada negativa antes de la replicación, de la transcripción y de la recombinación. Véase *DNA girasa*.
grupo de ligamiento Grupo de genes que tienen sus loci en el mismo cromosoma.
haploide Célula u organismo que tiene una sola dotación de cromosomas no emparejados. El número de cromosomas de los gametos.
haplotipo Grupo de alelos de loci íntimamente ligados que lleva un individuo y que normalmente se heredan como una unidad.
helicasa Enzima que participa en la replicación del DNA, desenrollando la doble hélice cerca de la horquilla de replicación.
hemizigoto Situación en la que un gen se encuentra en dosis sencilla en una célula diploide. Normalmente se aplica a los genes del cromosoma X de machos heterogaméticos.
hemofilia Carácter ligado al X en la especie humana, asociada con mecanismos defectuosos de la coagulación sanguínea.
hemoglobina (Hb) Proteína con hierro, que transporta oxígeno y que se encuentra principalmente en los glóbulos rojos de los vertebrados.
heredabilidad Medida del grado en que las diferencias fenotípicas observadas para un carácter son genéticas.
herencia Transmisión de caracteres de una generación a otra.
herencia citoplásmica Forma no mendeliana de la herencia de información genética que transmiten los orgánulos citoplásmicos autoreplicativos, como mitocondrias, cloroplastos, etc.
herencia cuantitativa Véase *herencia poligénica*.
herencia extranuclear Transmisión de caracteres por la información genética que contienen los orgánulos citoplásmicos, como las mitocondrias y cloroplastos.
herencia influenciada por el sexo Expresión fenotípica condicionada por el sexo del individuo. Un heterozigoto puede expresar un fenotipo en un sexo y el fenotipo alternativo en el otro sexo.
herencia limitada por el sexo Carácter que se expresa sólo en un sexo, aun cuando el carácter pueda no estar ligado al X.
herencia materna Transmisión de caracteres a través de factores genéticos citoplásmicos, como mitocondrias o cloroplastos.
herencia multifactorial Véase *herencia poligénica*.
herencia patroclina Forma de transmisión genética en la que los descendientes tienen el fenotipo del padre.
herencia poligénica Transmisión de un carácter fenotípico cuya expresión depende del efecto aditivo de una serie de genes.
herencia seudoautosómica Herencia de los alelos localizados en las regiones del cromosoma Y homólogas al cromosoma X.
heterocarión Célula somática que tiene núcleos de dos orígenes distintos.
heterocromatina Regiones de los cromosomas que se tiñen fuertemente, de replicación tardía, que están condensadas en interfase. Se cree que carece de genes estructurales.
heterodúplex Molécula de ácido nucleico de doble cadena en la que cada cadena polinucleotídica tiene un origen diferente. Estas estructuras pueden producirse como intermediarios en un suceso de recombinación, o por emparejamiento de moléculas complementarias de cadena sencilla *in vitro*.
heterozigoto Individuo con alelos distintos en uno o más loci. Tales individuos producen gametos distintos y por consiguiente no son raza pura.
Hfr Cepa bacteriana que presenta una alta frecuencia de recombinación. Estas cepas tienen un factor F integrado en el cromosoma, que es capaz de movilizar o transferir parte del cromosoma a una célula receptora F^-.
hibridación *in situ* Técnica de localización citológica de secuencias de DNA complementarias a un ácido nucleico o a un polinucleótido determinado.
hibridación *in situ* fluorescente (FISH) Método de hibridación *in situ* que utiliza sondas marcadas con una etiqueta fluorescente, lo que hace que el sitio de hibridación se vea fluorescente con luz ultravioleta bajo el microscopio.
hibrido Individuo resultante del cruce de dos padres de genotipos distintos.
hipótesis de Lyon La inactivación aleatoria en el desarrollo temprano de los cromosomas X paterno o materno de las células somáticas de las hembras de mamífero. Todas las células hijas tienen el mismo cromosoma X inactivado, dando lugar a un patrón en mosaico de la expresión de genes del cromosoma X.

hipótesis del balanceo Idea propuesta por Francis Crick que dice que la tercera base de un anticodón puede alinearse de varias maneras, permitiéndole reconocer a más de una base en los codones del mRNA.
hipótesis del tetranucleótido Teoría inicial de la estructura del DNA que proponía que esta molécula estaba compuesta de unidades repetidas, cada una formada por los cuatro nucleótidos adenosina, timidina, citosina y guanina.
hipótesis nula Utilizada en pruebas estadísticas, plantea que no hay diferencias entre los grupos de datos observados y esperados. Los métodos estadísticos, como el análisis de ji-cuadrado, se utilizan para comprobar la probabilidad de esta hipótesis.
histonas Proteínas acomplejadas al DNA en el núcleo. Son ricas en los aminoácidos básicos arginina y lisina y actúan en el enrollamiento del DNA para formar nucleosomas.
HLA Proteínas de la superficie celular, producidas por los loci de histocompatibilidad, implicadas en la aceptación o en el rechazo de injertos y de transplantes de tejidos y de órganos.
hnRNA Véase *RNA nuclear heterogéneo.*
homozigoto Individuo con alelos idénticos en uno o más loci. Estos individuos producen gametos idénticos y por ello son de raza pura.
homunculus Individuo en miniatura imaginado por los preformistas que se encontraba dentro del esperma o del óvulo.
horquilla de replicación Región de un cromosoma en forma de Y asociada al sitio de replicación.
huella dactilar Patrón de crestas superficiales y de espirales de la punta del dedo en la especie humana. También, el patrón que se obtiene mediante el corte enzimático de una proteína o de un ácido nucleico cuyo producto de digestión se somete a una cromatografía bidimensional o a una electroforesis. Véase también *huella del DNA.*
huella del DNA Método molecular para identificar a un miembro de una población o especie. El patrón de fragmentos de DNA se obtiene mediante digestión con enzimas de restricción, seguido de una hibridación por transferencia Southern utilizando sondas minisatélites. Véase también *secuencias STR.*
huella molecular de DNA por protección a digestión con DNasa I Véase *footprinting.*
Ig Véase *inmunoglobulina.*
impronta genómica Situación en donde la expresión de un gen depende de si el gen se ha heredado del padre o de la madre.
in vitro Literalmente, en vidrio; fuera de un organismo vivo; que ocurre en un ambiente artificial.
in vivo Literalmente, en vivo; que ocurre dentro del cuerpo vivo de un organismo.
inactivación del cromosoma X En hembras de mamíferos, interrupción aleatoria de la actividad transcripcional de uno de los cromosomas X. Este hecho, que ocurre tempranamente en el desarrollo, es un mecanismo de compensación de dosis. Se desconocen las bases moleculares de la inactivación, pero implica a una región llamada centro de inactivación del X (XIC) en el extremo proximal del brazo p. Algunos loci del extremo del brazo corto del cromosoma X pueden escapar a la inactivación. Véanse también *corpúsculo de Barr* e *hipótesis de Lyon.*
inductor Molécula efectora que activa la transcripción
infección múltiple Infección simultánea de una bacteria por más de un bacteriófago, a menudo de genotipos distintos.
influencia materna Véase *efecto materno*
ingeniería genética Técnica de alteración de la constitución genética de células o de individuos mediante la eliminación, la inserción o la modificación selectiva de genes individuales o de grupos de genes.
inmunoglobulina (Ig) Tipo de proteínas séricas que tienen las propiedades de los anticuerpos.
intensificador Identificada originalmente como una secuencia de 72 pb del genoma del virus SV40, que incrementa la actividad transcripcional en los genes estructurales cercanos. Se han identificado secuencias similares que intensifican la transcripción en los genomas de los eucariotas. Los intensificadores pueden actuar incluso a una distancia de miles de pares de bases y pueden localizarse corriente arriba o corriente abajo, a 5′ o a 3′, o dentro del gen que afectan, y por lo tanto son diferentes a los promotores.
intercambio entre cromátidas hermanas (SCE) Entrecruzamiento que puede ocurrir en las células en mitosis y en meiosis; implica el intercambio recíproco de material cromosómico entre cromátidas hermanas, unidas por un centrómero común. Tales intercambios se pueden detectar citológicamente después de la incorporación de BrdU en los cromosomas que se replican.
interfase Parte del ciclo celular entre divisiones.
interferencia Medida del grado en que un entrecruzamiento afecta a la incidencia de otro entrecruzamiento en una región adyacente de la misma cromátida. La interferencia negativa aumenta la probabilidad de otro entrecruzamiento; la interferencia positiva disminuye la probabilidad de un segundo entrecruzamiento.
intrón Porción de DNA entre regiones codificantes de un gen que se transcribe pero que no aparece en el mRNA maduro.
inversión Aberración cromosómica en la que el orden de un segmento se ha invertido.
inversión paracéntrica Inversión cromosómica que no incluye al centrómero.
inversión pericéntrica Inversión cromosómica que implica a los dos brazos del cromosoma y por ello incluye al centrómero.
isoaglutinógeno Factor antigénico o sustancia presente en la superficie de las células que puede inducir la formación de anticuerpos.
isocromosoma Cromosoma aberrante, con dos brazos idénticos y loci homólogos.
isótopo radioactivo Una de las formas de un elemento que se diferencia por su peso atómico y que posee un núcleo inestable que emite radiación ionizante mientras se desintegra.
isótopos Formas de un elemento químico que tienen el mismo número de protones y de electrones pero que difieren en el número de neutrones contenidos en el núcleo atómico.
isozima Cualquiera de las dos o más formas diferentes de una enzima que tienen propiedades químicas idénticas, o casi idénticas, pero que difieren en algún aspecto, como la carga eléctrica neta, el pH óptimo, el número y tipo de subunidades o la concentración de sustrato.
kilobase (kb) Unidad de longitud que consta de 1.000 nucleótidos.
lazo de inversión Configuración cromosómica que resulta de la sinapsis de cromosomas homólogos, uno de los cuales lleva una inversión.
leptoteno Estado inicial de la profase I de la meiosis, en la que los cromosomas se hacen visibles y a menudo se disponen en una configuración de ramillete, con uno o ambos extremos de los cromosomas reunidos en un punto interno de la membrana nuclear.
letales equilibrados Genes letales recesivos, no alélicos, que se encuentran en cromosomas homólogos distintos. Cuando se cruzan organismos que llevan genes letales equilibrados, sólo sobreviven los descendientes con genotipos idénticos a los padres (heterozigotos).

ley de Hardy-Weinberg Principio según el cual las frecuencias génicas y genotípicas permanecen en equilibrio en una población infinitamente grande, con apareamiento aleatorio y en ausencia de mutación, migración y selección.

ley de la suma Ley que afirma que la probabilidad que ocurran dos sucesos mutuamente excluyentes es igual a la suma de sus probabilidad individuales.

ley del producto En estadística, la ley que afirma que la probabilidad de dos sucesos independientes que se producen simultáneamente es igual al producto de las probabilidades de cada suceso por separado.

ligamiento Situación en la que dos o más genes no alélicos tienden a heredarse juntos. Los genes ligados tienen sus loci en el mismo cromosoma; no se transmiten independientemente, pero se pueden separar por entrecruzamiento.

ligamiento al X Patrón de herencia que resulta de genes localizados en el cromosoma X.

ligamiento al Y Modo de herencia que presentan los genes localizados en el cromosoma Y.

ligamiento completo Situación en la que dos genes se localizan tan cerca que no se produce recombinación entre ellos.

ligamiento incompleto Separación ocasional de dos genes situados en el mismo cromosoma por recombinación.

línea germinal Linaje celular embrionario que forma las células reproductoras (óvulos y esperma).

lisis Desintegración de una célula como consecuencia de la ruptura de su membrana.

lisogenia Proceso mediante el cual el DNA de un fago queda reprimido e integrado en el cromosoma de la bacteria que infecta.

loci de carácter cuantitativo (QTL) Dos o más genes que actúan sobre un carácter cuantitativo.

loci principales de histocompatibilidad (MHC) En la especie humana, el complejo HLA; y en el ratón, el complejo H2.

locus (plural, **loci**) Lugar de un cromosoma en donde se localiza un gen dado.

locus complejo Gen en el que se pueden identificar una serie de pseudoalelos funcionalmente relacionados por análisis de recombinación (p.e. el locus *bithorax* de *Drosophila*).

lugar frágil Hueco o región heredable no teñida de un cromosoma que se puede inducir para generar roturas cromosómicas.

mapa citológico Esquema mostrando la localización de los genes en lugares concretos del cromosoma.

mapa cromosómico Esquema mostrando la localización de genes en el cromosoma.

mapa de destino Diagrama de un embrión que muestra la localización de las células cuyo destino de desarrollo se conoce.

material de reacción cruzada (CRM) Forma no funcional de una enzima, producida por un gen mutante, que es reconocida por anticuerpos contra la enzima normal.

mecanismo de aislamiento Cualquier barrera al intercambio de genes entre poblaciones distintas de un grupo de organismos. En general, el aislamiento se puede clasificar en espacial, ambiental o reproductivo.

mecanismo de aislamiento postzigótico Factor que evita o reduce el intercambio genético actuando después de la fecundación, al producir híbridos no viables, estériles o con baja eficacia.

mecanismo de aislamiento prezigótico Factor que reduce el intercambio genético evitando el cortejo, el apareamiento o la fecundación.

media Promedio aritmético

mediana En un grupo de números, el valor por encima y por debajo del cual hay un número igual de datos o medidas.

medio mínimo Medio que contiene sólo aquellos nutrientes que permitirán el crecimiento y reproducción de cepas silvestres de un organismo.

meiosis Proceso en la gametogénesis o esporogénesis en el que la replicación de los cromosomas viene seguida de dos divisiones nucleares para dar lugar a cuatro células haploides.

merozigoto Bacteria parcialmente diploide que tiene, además de su propio cromosoma, un fragmento cromosómico introducido en la célula por transformación, transducción o conjugación.

metabolismo Suma de cambios químicos de los organismos vivos en los que se genera y se utiliza energía.

metafase Fase de la división celular en la que se sitúan los cromosomas condensados en un plano central entre los dos polos de la célula y en la que los cromosomas quedan unidos a las fibras del huso.

metahembra En *Drosophila*, una hembra poco desarrollada, con poca viabilidad, en la que la proporción de cromosomas X respecto de dotaciones autosómicas excede de 1. Anteriormente se denominaba superhembra.

metamacho En *Drosophila*, un macho poco desarrollado, con poca viabilidad, en el que la proporción de cromosomas X respecto de dotaciones autosómicas es menor de 0,5. Anteriormente se denominaba supermacho.

metilación Transferencia enzimática de grupos metilo desde la S-adenosilmetionina a moléculas biológicas, como fosfolípidos, proteínas, RNA y DNA. La metilación del DNA está asociada con una reducción de la expresión génica y con fenómenos epigenéticos, como la impronta genómica.

MHC Véase *loci principales de histoincompatibilidad*

micra Véase *micrómetro*.

micrómetro (μm) Unidad de longitud igual a 1×10^{-6} metros. Antes se denominaba micra.

milímetro (mm) Unidad de longitud igual a 1×10^{-3} metros.

minisatélite Repeticiones cortas en tandem de 10 a 100 nucleótidos, ampliamente dispersas en el genoma de los eucariotas. El número de repeticiones en cada locus es variable; estos loci se conocen como número variable de repeticiones en tandem (VNTR). Cada variación representa un alelo VNTR, y muchos loci tienen docenas de alelos. Los VNTR se utilizan en la huella del DNA. Véase también *secuencias STR*.

mitocondria Orgánulo citoplásmico, autorreproducible, que se encuentra en las célula eucariotas y que es el lugar de la síntesis de ATP.

mitógeno Sustancia que estimula la mitosis en células que no se dividen (por ejemplo, fitohematoglutinina)

mitosis Tipo de división celular que da lugar a dos células, cada una con los mismos cromosomas y complementos genéticos que la célula paterna.

moda En un grupo de datos, el valor que se da con mayor frecuencia.

modelo de fibra plegada Modelo de organización del cromosoma eucariota en el que cada cromátida hermana está compuesta por una sola fibra de DNA de doble cadena y proteínas, que está doblada como una madeja de hilo enrollada de manera compacta.

modelo del círculo rodante Modelo de replicación del DNA en el que el punto de crecimiento, o la horquilla de replicación, giran al-

rededor de una cadena molde circular; en cada paso alrededor del círculo, la cadena recién sintetizada desplaza a la cadena previamente replicada, produciendo una serie de copias contiguas de la cadena molde.
molde Molécula de DNA de cadena sencilla o de RNA que especifica la secuencia nucleotídica de una cadena sintetizada por una polimerasa.
molécula efectora Molécula pequeña, biológicamente activa, que regula la actividad de una proteína uniéndose a un sitio receptor específico de esta.
monosómico Aneuploidía en la que se ha perdido un miembro de una pareja de cromosomas; que tiene un número de cromosomas $2n - 1$.
motivo hélice-giro-hélice Estructura de una región de proteínas de unión a DNA en la que un giro de cuatro aminoácidos mantiene las dos hélices a formando ángulos rectos entre sí.
mRNA Véase *RNA mensajero*.
mRNA policistrónico Molécula de RNA mensajero que codifica la secuencia aminoacídica de dos o más cadenas polipeptídicas de genes estructurales adyacentes.
mtDNA Véase *DNA mitocondrial*.
muestreo de vellosidad coriónica (CVS) Técnica de diagnóstico prenatal que recupera células fetales intravaginales del corion y las utiliza para detectar defectos citogenéticos y bioquímicos del embrión.
mutación Proceso que da lugar a una alteración en el DNA o en la estructura de un cromosoma; el origen de la mayoría de los alelos.
mutación *cdc* Tipo de mutación en levaduras que afecta a la temporalización y a la progresión del ciclo celular.
mutación con sentido erróneo Mutación que altera un codón convirtiéndolo en el de otro aminoácido, lo que provoca que se haga un producto de traducción alterado.
mutación condicional Mutación que expresa un fenotipo silvestre en ciertas condiciones (permisivas) y un fenotipo mutante en otras condiciones (restrictivas).
mutación cromosómica Véase *aberración cromosómica*.
mutación de cambio de fase Suceso mutacional que conduce a la inserción de uno o más pares de bases en un gen, desplazando la fase de lectura de los codones en todos los codones situados tras el sitio de mutación.
mutación espontánea Mutación no inducida por agentes mutágenos.
mutación génica Véase *mutación puntual*.
mutación homeótica Mutación que provoca que un tejido que normalmente está determinado para formar un órgano o una parte del cuerpo específica altere su diferenciación y forme otra estructura.
mutación neutra Mutación que no tiene significado adaptativo inmediato o efecto fenotípico.
mutación preadaptativa Mutación que posteriormente adquiere significado adaptativo.
mutación puntual Mutación que se puede cartografiar en un solo locus. A nivel molecular, una mutación que resulta de la sustitución de un nucleótido por otro.
mutación sensible a la temperatura Mutación condicional que produce un fenotipo mutante en un rango de temperatura y un fenotipo silvestre en otro rango de temperatura.
mutación sin sentido Mutación que cambia un codón convirtiéndolo en uno de los que no codifican ningún aminoácido: UAG, UAA y UGA. Conduce a la terminación prematura de la traducción del mRNA.
mutación somática Mutación no heredable que se produce en una célula somática.
mutación supresora Mutación que restaura (completa o parcialmente) la función perdida por una mutación previa en otro sitio.
mutagénesis específica de sitio Proceso que utiliza como cebador un oligonucleótido sintético que contiene una base o una secuencia mutante para introducir una mutación en un sitio específico de un gen clonado.
mutágeno Cualquier agente que de lugar a un aumento de la tasa de mutación.
mutante Célula u organismo que lleva un gen alterado o mutante.
mutón La unidad de mutación más pequeña de un gen, que corresponde al cambio de una sola base.
nanómetro (nm) Unidad de longitud igual a 1×10^{-9} metros.
no disyunción Error durante la división celular en la que los cromosomas homólogos (en la meiosis) o las cromátidas hermanas (en la mitosis) no se separan y migran al mismo polo; responsable de defectos como la monosomía o la trisomía..
NOR Véase *región organizadora nucleolar*.
nucleasa Enzima que rompe los enlaces de las moléculas de ácidos nucleicos.
nucleasa S_1 Desoxirribonucleasa que corta y degrada moléculas de DNA de cadena sencilla.
núcleo Orgánulo citoplásmico de las células eucariotas, rodeado por una membrana que contiene a los cromosomas y al nucleolo.
nucleoide Región en el citoplasma de las células procariotas que contiene el DNA.
nucleolo Orgánulo nuclear que es el lugar de la biosíntesis de los ribosomas; normalmente asociado o formado en asociación con la NOR.
nucleósido Purina o pirimidina unida covalentemente a una molécula de un azúcar ribosa o desoxirribosa.
nucleosoma Complejo de cuatro moléculas de histona, cada una duplicada, rodeado por dos vueltas de una molécula de DNA. Es una de las unidades básicas de la estructura de los cromosomas de eucariotas.
nucleótido Nucleósido unido covalentemente a un grupo fosfato. Los nucleótidos son las piezas básicas para la construcción de los ácidos nucleicos. Los nucleótidos, que generalmente se encuentran en el DNA, son el ácido desoxiadenílico, el ácido desoxicitidílico, el ácido desoxiguanílico y el ácido desoxitimidílico. Los nucleótidos del RNA son el ácido adenílico, el ácido citidílico, el ácido guanílico y el ácido uridílico.
nulisómico Describe a un individuo con una aberración cromosómica en la que se han perdido los dos miembros de una pareja de cromosomas.
número de cruces Número de veces que el eje de un DNA dúplex se cruza con sigo mismo por superenrollamiento.
número de unión Número de veces que dos cadenas de un DNA circular cerrado dúplex se cruzan entre sí.
oligonucleótido Secuencia lineal de 10 a 20 nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster 5′-3′.
oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) Nucleótidos sintéticos, generalmente de 15 a 20 pb de longitud, que en condiciones cuidadosamente controladas hibridarán solo con una secuencia complementaria con un emparejamiento complementario perfecto. En las mismas condiciones, los ASO con un desemparejamiento de un nucleótido no hibridarán.

oncogén Gen cuya actividad promueve la proliferación incontrolado en células eucariotas.
operón Unidad genética que está formada por uno o más genes estructurales que codifican polipéptidos y por un gen operador adyacente que controla la actividad transcripcional del gen o de los genes estructurales.
organismo modificado genéticamente (GMO) Vegetal o animal que lleva un gen de otra especie, transferido a su genoma utilizando la tecnología del DNA recombinante, y en donde el gen se expresa para dar lugar a un producto génico.
organismo transgénico Organismo cuyo genoma se ha modificado mediante la introducción de secuencias de DNA externo en la línea germinal.
origen de la replicación (ori) Lugar en un cromosoma en donde se inicia la replicación del DNA.
palíndromo Palabra, número, verso o frase que se lee lo mismo de izquierda a derecha que de derecha a izquierda (p.e., dábale arroz a la zorra el abad). En los ácidos nucleicos, una secuencia en la que los pares de bases se leen igual en las dos cadenas complementarias en la dirección 5′-3′. Por ejemplo:

5′-GAATTC-3′
3′-CTTAAG-5′

A menudo esto ocurre en sitios de reconocimiento y de corte de endonucleasas de restricción.
pangénesis Teoría descartada del desarrollo que postula la existencia de pangenes, pequeñas partículas de todas las partes del cuerpo que se concentran en los gametos, que pasan los caracteres de generación en generación, mezclando los caracteres de los padres en los descendientes.
paquiteno Estadio de la profase I de la meiosis en la que los cromosomas homólogos en sinapsis se escinden longitudinalmente (excepto por el centrómero), dando lugar a un grupo de cuatro cromátidas llamada tétrada.
par de nucleótidos Par de nucleótidos (A y T o G y C) en cadenas opuestas de la molécula de DNA que están unidos por puentes de hidrógeno.
paradoja del valor *C* Paradoja aparente por la que no hay ninguna relación entre el tamaño del genoma y la complejidad evolutiva de las especies. Por ejemplo, el valor *C* (tamaño del genoma haploide) de los anfibios varía por un factor de 100.
partenogénesis Desarrollo de un óvulo sin fecundación.
particula κ (kappa) Partícula citoplásmica con DNA que se encuentra en ciertas cepas de *Paramecium aurelia*. Cuando estas partículas, que se autorreproducen, se transfieren a un medio de crecimiento, desprenden una toxina, la paramecina, que mata a otras cepas sensibles. El gen nuclear *K* es el responsable del mantenimiento de las partículas kappa en el citoplasma.
paseo cromosómico Método de análisis de largas secuencias de DNA, en el que el extremo de un segmento de DNA se subclona y se utiliza de sonda para identificar otros clones que solapen con el primer clon.
pauta abierta de lectura (ORF) Secuencia de nucleótidos organizada en tripletes que codifican los aminoácidos de una proteína. Localizada entre un codón de iniciación y un codón de terminación dentro del gen.
pauta de lectura Secuencia lineal de codones en un ácido nucleico
penetración La frecuencia, expresada en porcentajes, de individuos de un genotipo dado que manifiestan, al menos en algún grado, un fenotipo mutante concreto asociado con un carácter.
perfil de fusión (T_m) Temperatura a la que la mitad de una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena está disociada en cadenas sencillas. Se toma como la temperatura de fusión de dicho tipo de ácido nucleico.
pilus Proyección filamentosa de la superficie de una bacteria. Asociada a menudo con células que poseen factores F.
pilus F Véase *pilus*.
placa ecuatorial Véase *placa metafásica*.
placa metafásica Disposición de los cromosomas mitóticos o meióticos en el ecuador de la célula durante la metafase.
plasma germinal Material hereditario que se transmite de generación en generación.
plásmido Molécula de DNA circular extracromosómico (llevando a menudo información genética) que se replica independientemente del cromosoma del huésped.
pleiotropía Situación en la que una sola mutación afecta simultáneamente a varios caracteres.
ploidía Término que se refiere a la dotación cromosómica básica o a múltiplos de dicha dotación.
población Grupo local de individuos que pertenecen a la misma especie y que se cruzan entre sí real o potencialmente.
polimerasa del RNA Enzima que cataliza la formación de una cadena polinucleotídica de RNA utilizando como molde la secuencia base de una molécula de DNA.
polimerasas Enzimas que catalizan la formación de DNA y de RNA a partir de desoxirribonucleótidos y de ribonucleótidos, respectivamente.
polimorfismo Existencia de dos o más fenotipos discontinuos que segregan en una población.
polimorfismo cromosómico Estructuras alternativas o reordenaciones de un cromosoma presentes en miembros de una población.
polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) Variación en la longitud de los fragmentos de DNA generados por endonucleasas de restricción. Estas variaciones están ocasionadas por mutaciones que crean o suprimen sitios de corte para las enzimas de restricción. Los RFLP se heredan de manera codominante y pueden utilizarse como marcadores genéticos.
polimorfismo equilibrado Polimorfismo que se mantiene en una población por selección natural.
polimorfismo genético Coexistencia estable de dos o más genotipos discontinuos en una población. Cuando las frecuencias de los dos alelos llegan a un equilibrio, la situación se denomina polimorfismo equilibrado.
polinucleótido Secuencia lineal de más de 20 nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster 5′-3′. Véase *oligonucleótido*.
polipéptido Molécula formada por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos covalentes. Este término se utiliza para denominar a la cadena aminoacídica antes de que asuma su configuración tridimensional funcional.
poliploide Célula o individuo que tiene más de dos dotaciones de cromosomas.
polirribosoma Véase *polisoma*.
polisoma Estructura formada por dos o más ribosomas asociados a mRNA, ocupados en la traducción. Antes se denominaba polirribosoma.
portador Individuo heterozigoto para un carácter recesivo.
preformacionismo La idea desacreditada de que un organismo se desarrolla por crecimiento de estructuras ya presentes en el óvulo o esperma.

prión Agente patógeno infeccioso desprovisto de ácidos nucleicos y formado principalmente por una proteína, la PrP, con un peso molecular de 27.000 a 30.000 daltons. Se sabe que los priones provocan la tembladera, una enfermedad neurodegenerativa en ovejas; la encefalopatía espongiforme bovina (o mal de las vacas locas) en el vacuno; y enfermedades parecidas en humanos, como el Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

probabilidad Razón de la frecuencia de un suceso dado respecto de la frecuencia de todos los sucesos posibles.

probando Individuo en el que se detecta por primera vez un carácter de interés, determinado genéticamente. Anteriormente se conocía como propositus.

procariotas Organismo que carece de membrana nuclear, meiosis y mitosis. Las bacterias y las cianofíceas son ejemplos de organismos procariotas.

profago Genoma de un fago integrado en un cromosoma bacteriano. Las bacterias que llevan profagos se dice que son lisogénicas.

progenie Descendientes producidos en un cruce.

promotor Región que tiene funciones reguladoras y a la que se une la polimerasa del RNA antes de iniciar la transcripción.

proporción de sexos Véanse *proporción de sexos primaria* y *secundaria*.

proporción de sexos primaria Proporción de macho y hembras en el momento de la fecundación.

proporción de sexos secundaria La proporción de machos y hembras en el momento del nacimiento.

propositus Véase *probando*.

proteína Molécula compuesta por uno o más polipéptidos, formados por aminoácidos unidos covalentemente.

proteína activadora por catabolito Véase *CAP*.

proteína represaora *lac* Proteína que se une al operador en el operón *lac* y bloquea la transcripción.

proteínas de desenrollamiento Proteínas nucleares que actúan durante la replicación del DNA para desestabilizar y desenrollar la hélice de DNA por delante de la horquilla de replicación.

proteínas de unión a cadena sencilla (SSB) En la replicación del DNA, proteínas que se unen y estabilizan a regiones de cadena sencilla del DNA que resultan de la acción de proteínas desespiralizantes.

proteómica Estudio de las proteínas presentes en una células en un momento dado.

protooncogén Gen que normalmente funciona para iniciar o mantener la división celular. Los protooncogenes se pueden convertir en oncogenes por alteraciones en su estructura o en su expresión.

protoplasto Célula vegetal o bacteriana a la que se le ha eliminado la pared celular. A veces se llama esferoplasto.

protótrofo Cepa (normalmente de microorganismo) que es capaz de crecer en un medio mínimo definido. Las cepas silvestres normalmente se consideran protótrofas.

prueba de alelismo Véase *prueba de complementación*.

prueba de complementación Prueba genética para determinar si dos mutaciones se encuentran dentro del mismo gen. Si se introducen dos mutaciones simultáneamente en una célula y se produce un fenotipo silvestre (es decir, complementan entre si) normalmente no son alélicas. Si se produce fenotipo mutante, las mutaciones no complementan y normalmente son alélicas.

prueba de la fluctuación Análisis estadístico desarrollado por Salvatore Luria y por Max Delbrück para determinar si una mutación bacteriana aparece espontáneamente o si se produce en respuesta a agentes selectivos.

prueba de sintenia En genética de células somáticas, método para determinar si dos genes se encuentran en el mismo cromosoma.

pseudoalelos Genes que se comportan como alelos por complementación, pero que pueden separarse por recombinación.

pseudodominancia La expresión de un alelo recesivo en un homólogo por deleción del alelo dominante en el otro homólogo.

pseudogén Gen no funcional, con homología de secuencia a un gen estructural conocido presente en cualquier sitio del genoma. Se diferencia de sus parientes funcionales por inserciones o deleciones y por la presencia de secuencias flanqueantes repetidas directas de 10 a 20 nucleótidos.

puente de hidrógeno Atracción electrostática entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo muy electronegativo, como un átomo de oxígeno o de nitrógeno, o de otro átomo que sea electronegativo o que contenga un par de electrones no compartidos.

***puff* cromosómico** Una desespiralización e hinchamiento localizado en los cromosomas politénicos, considerado normalmente como el reflejo de transcripción activa.

punto de control G1 Momento en la fase G1 del ciclo celular en el que la célula queda obligada a iniciar la síntesis de DNA y continuar el ciclo, o entrar en el estado de reposo G0.

punto R El punto en el estadio G1 del ciclo celular en el que se obliga a realizar la síntesis de DNA y a seguir otro ciclo celular, o a que la célula se retire del ciclo y quede quiescente. También se conoce como punto de restricción.

puntuación *lod* Método estadístico utilizado para determinar si dos loci están o no ligados. Una puntuación *lod* (logaritmo de la probabilidad) de 4 indica que el ligamiento es 10.000 veces más probable que el no ligamiento. Por convención, la puntuación *lod* de 3 a 4 indica ligamiento

quiasma Cruce de los filamentos de cromátidas no hermanas que se observa en el diploteno de la primera división meiótica. Se considera la evidencia citológica del intercambio de material cromosómica, o entrecruzamiento.

quimiotaxis Respuesta positiva o negativa a un gradiente químico.

rad Unidad de dosis de radiación absorbida con una energía igual a 100 ergios por gramo de tejido irradiado.

ratones *knockout* Para producir ratones *knockout*, un gen normal clonado se inactiva mediante la inserción de un marcador, como un gen de resistencia a antibióticos. El gen alterado se transfiere a células madre embrionarias, en las que el gen alterado reemplazará el gen normal (en algunas células). Estas células se inyectan a un embrión en estadio de blastómero, produciéndose un ratón que se aparea para producir ratones que sea homocigotos para este gen mutado.

raza Subgrupo distinto genotípicamente o geográficamente de una especie.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método para amplificar segmentos de DNA que utiliza ciclos de desnaturalización, de emparejamiento a cebadores y de síntesis de DNA dirigida por la polimerasa del DNA.

reanillamiento Formación de moléculas de DNA de doble cadena a partir de cadenas sencillas disociadas.

recesivo Término que describe a un alelo que no se expresa en heterozigosis.

recombinación Proceso que da lugar a la formación de nuevas combinaciones de genes en el cromosoma.

recón Término acuñado por Seymour Benzer para denominar las unidades genéticas más pequeñas entre las que se puede producir recombinación.

región operadora Región de una molécula de DNA que interacciona con una proteína represora específica para controlar la expresión de un gen o de un grupo de genes adyacentes.

región organizadora nucleolar (NOR) Región cromosómica que contiene los genes para el rRNA; muy a menudo se encuentra asociado físicamente con el nucleolo.

región variable Porción de una molécula de inmunoglobulina cuya secuencia aminoacídica muestra muchas diferencias entre anticuerpos de diferentes especificidades.

regiones hipervariables Las regiones de moléculas de anticuerpos que se unen a los antígenos. Estas regiones tienen un alto grado de diversidad en su contenido de aminoácidos.

rem Equivalente de radiación en humanos; dosis de radiación que causa el mismo efecto biológico que un roentgen de rayos X.

renaturalización Proceso mediante el que una proteína o un ácido nucleico desnaturalizado recupera su estructura tridimensional normal.

reparación de emparejamientos erróneos Proceso de reparación por escisión, mediante el que una base o bases no emparejadas se escinden, y se sintetiza un nuevo segmento utilizando la cadena complementaria de molde.

reparación por escisión Eliminación de segmentos dañados del DNA seguida de reparación. La escisión puede incluir la eliminación de bases (reparación de bases) o de una serie de nucleótidos dañados (reparación de nucleótidos). El hueco creado por la escisión lo llena la polimerasa del DNA y los extremos se ligan para formar una molécula intacta.

reparación por fotorreactivación Reparación inducida por la luz de daños causados por la exposición a luz ultravioleta. Está asociado a un sistema enzimático intracelular.

repetición de trinucleótidos Grupo de tres nucleótidos (como CTG) repetidos en tándem, dentro o cerca de un gen, que experimenta una expansión del número de copias, causando una enfermedad.

repeticiones en tándem de número variable (VNTR) Secuencias cortas de DNA (de 2 a 20 nucleótidos) presentes como repeticiones en tándem entre dos sitios reconocidos por enzimas de restricción. La variación en el número de repeticiones crea fragmentos de DNA de longitudes diferentes tras digerir con enzimas de restricción.

repeticiones terminales largas (LTR) Secuencia de varios cientos de pares de bases que se encuentra en los extremos de los DNA retrovíricos.

replicación Proceso de síntesis de DNA

replicación bidireccional Mecanismo de replicación del DNA en el que dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas a partir de un origen de replicación común.

replicación discontinua del DNA Síntesis de DNA en fragmentos discontinuos en la cadena retrasada de la horquilla de replicación. La DNA ligasa une estos fragmentos, conocidos como fragmentos de Okazaki, para formar una cadena continua.

replicación semiconservativa Modelo de replicación del DNA en el que una molécula de doble cadena se replica de manera que las moléculas hijas están formadas por una cadena paterna (vieja) y por una cadena recién sintetizada.

replicón Región cromosómica o elemento genético libre que contiene las secuencias de DNA necesarias para la iniciación de la replicación del DNA.

replisoma Término utilizado para describir el complejo de proteínas, incluyendo la polimerasa del DNA, que se ensambla en la horquilla de replicación bacteriana para sintetizar DNA.

represión por catabolito Inactivación selectiva de un operón por el producto metabólico de las enzimas codificadas por dicho operón.

represor Proteína que se une a una secuencia reguladora, adyacente a un gen y que bloquea la transcripción del gen.

reproducción asexual Producción de descendientes en ausencia de cualquier proceso sexual.

reproducción sexual Reproducción mediante la fusión de gametos, que son productos haploides de la meiosis.

resolución En un sistema óptico, la distancia más corta entre dos puntos o líneas que permite que se perciban como dos puntos o dos líneas.

respuesta SOS Inducción de enzimas en *E. coli* para reparar DNA dañado. La respuesta implica la activación de una enzima que corta un represor, activando una serie de genes implicados en la reparación del DNA.

retículo endoplasmático Sistema de orgánulos membranosos del citoplasma de las células eucariotas. La superficie externa de las membranas pueden estar tapizadas de ribosomas (RE rugoso) o no (ER liso)

retrotranscriptasa Polimerasa que utiliza RNA de molde para transcribir una molécula de DNA de cadena sencilla como producto.

retrovirus Virus con RNA como material genético que utiliza la enzima transcriptasa inversa durante su ciclo biológico.

reversión Mutación que restaura el fenotipo silvestre.

revolución verde Programa que da lugar a la duplicación o triplicación de las cosechas por el desarrollo de nuevas variedades de cereales con tallos más cortos y una mayor resistencia a enfermedades.

RFLP Véase *polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.*

ribosa Azúcar de cinco carbonos asociado a los ribonucleótidos que se encuentran en el RNA.

ribosoma Orgánulo ribonucleoproteico formado por dos subunidades que contienen, cada una, RNA y proteínas. Los ribosomas son los lugares en donde los codones del mRNA se traducen en la secuencia aminoacídica de una cadena polipeptídica.

RNA Véase *ácido ribonucleico.*

RNA de transferencia (tRNA) Pequeña molécula de ácido ribonucleico que tiene un segmento con tres bases (anticodón) que reconoce a un codón en el mRNA, un sitio de unión para un aminoácido específico y un lugar de reconocimiento para la interacción con los ribosomas y con la enzima que le une a su aminoácido específico.

RNA mensajero (mRNA) Molécula de RNA transcrita a partir de DNA y traducida en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido.

RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) Colección de transcritos de RNA en el núcleo, que representan los precursores y los intermediarios del procesado de los rRNA, mRNA y tRNA. También representan transcritos de RNA que no serán transportados al citoplasma, como los snRNA.

RNA nuclear pequeño (snRNA) Tipo de moléculas de RNA cuyo tamaño abarca desde 90 hasta 400 nucleótidos. Los abundantes snRNA están presentes en 1×10^4 a 1×10^6 copias por célula, asociados a proteínas y forman las partículas RNP conocidas como snRNP o *snurps*. Seis snRNA ricos en uridinas, conocidos como U1 a U6, están localizados en el nucleoplasma, y se conoce su secuencia nucleotídica

completa. Los snRNA están implicados en el procesado de los pre-mRNA y pueden tener una serie de funciones de corte y ligación.

RNA ribosómico (rRNA) Las moléculas de RNA que son componentes estructurales de las subunidades ribosómicas. En procariotas hay moléculas de 16*S*, 23*S* y 5*S*; en eucariotas hay moléculas de 18*S*, 28*S* y 5*S*.

RNasa Tipo de enzimas que hidrolizan moléculas de RNA.

roentgen (R) Unidad de medida de la cantidad de radiación que corresponde a la generación de $2{,}083 \times 10^9$ pares de iones en un centímetro cúbico de aire a 0 °C y a una presión atmosférica de 760 mm de mercurio.

rRNA Véase *RNA ribosómico.*

RTF Véase *factor de transferencia de resistencia*

SCE Véase *intercambio entre cromátidas hermanas.*

secretor Individuo que tiene formas solubles de los antígenos de los grupos sanguíneos A y/o B presentes en la saliva y en otros fluidos corporales. Esta situación está ocasionada por un gen autosómico dominante no ligado al locus *AB0* (locus *I*).

secuencia *Alu* Secuencia de DNA dispersa de unos 300 pb encontrada en el genoma de los primates, que es cortada por la enzima de restricción *Alu*I. Las secuencias *Alu* están formadas por un dímero cabeza-cola, con el primer monómero de unas 140pb y el segundo de unas 170 pb. En la especie humana, están dispersas por el genoma y hay entre 300.000 a 600.000 copias, constituyendo del 3 al 6 por ciento del genoma. Véase *elementos interdispersos cortos.*

secuencia consenso Secuencia nucleotídica en el DNA o de aminoácidos en una proteína, que es básicamente común aunque no necesariamente idéntica.

secuencia de inserción Véase *elemento IS.*

secuencia de Shine-Dalgarno Nucleótidos AGGAGG presentes en la secuencia líder de los genes procariotas que sirven de sitio de unión del ribosoma. El RNA 16*S* de la subunidad ribosómica pequeña contiene una secuencia complementaria a la que se une el mRNA.

secuencia intercala Véase *intrón.*

secuencia líder Porción de una molécula de mRNA desde el extremo 5' hasta el codón de inicio; puede contener sitios reguladores y de unión a ribosomas.

secuencias de DNA repetitivo Secuencias de DNA presentes en muchas copias en el genoma haploide

secuencias específicas de expresión (EST) Toda o parte de la secuencia de nucleótidos de clones de cDNA. Se utilizan como marcadores en la construcción de mapas genéticos.

secuencias que se replican autónomamente (ARS) Orígenes de replicación, de unos 100 nucleótidos de longitud, que se encuentran en los cromosomas de las levaduras. Las ARS también se encuentran en el DNA de los orgánulos.

secuencias STR Repeticiones cortas en tándem de 2 a 9 pares de bases que se encuentran dentro de secuencias minisatélites. Estas secuencias se utilizan para preparar perfiles de DNA en técnicas forenses, identificación de la paternidad y otras aplicaciones.

segregación Separación de los cromosomas homólogos hacia gametos distintos en la meiosis.

selección Fuerza que consigue cambios en la frecuencia de los alelos y de los genotipos en poblaciones mediante la reproducción diferencial.

selección clonal Teoría del sistema inmunitario que propone que la diversidad de anticuerpos precede a la exposición al antígeno y que el antígeno actúa seleccionando las células que contienen su anticuerpo específico para que proliferen.

selección direccional Fuerza selectiva que cambia la frecuencia de un alelo en una dirección dada, hacia su fijación o hacia su eliminación.

selección disruptiva Selección simultánea de los extremos fenotípicos de una población, dando lugar, normalmente, a la producción de dos cepas discontinuas fenotípicamente.

selección estabilizadora Reproducción diferencial de aquellos individuos que tienen genotipos próximos a la media de la población. Eliminación selectiva de genotipos de ambos extremos.

selección natural Reproducción diferencial de algunos miembros de una especie como consecuencia de la eficacia variable que confieren las diferencias genotípicas.

semiesterilidad Situación en la que una proporción de los zigotos son inviables.

sexducción Transmisión de genes cromosómicos de una bacteria donante a una receptora mediante el factor F.

sexo heterogamético Sexo que produce gametos con cromosomas sexuales distintos.

sexo homogamético Sexo que produce gametos que no difieren en cuanto a los cromosomas sexuales que llevan; en los mamíferos, la hembra es el sexo homogamético.

simbionte Organismo que coexiste en relación mutuamente beneficiosa con otro organismo.

sinapsis El apareamiento de los cromosomas homólogos en la meiosis.

sincarion El núcleo de un zigoto que resulta de la fusión de dos núcleos de los gametos. También se utiliza en la genética de células somáticas para describir el producto de la fusión nuclear.

síndrome Grupo de señales o síntomas que se dan juntos y caracterizan a una enfermedad o anomalía.

síndrome de Klinefelter Trastorno genético en varones ocasionado por la presencia de un cromosoma X extra. Los varones Klinefelter son XXY en lugar de XY. Este síndrome está asociado con un mayor desarrollo de las glándulas mamarias, testículos pequeños, esterilidad y, ocasionalmente, retraso mental.

síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) Enfermedad infecciosa provocada por un retrovirus denominado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La enfermedad se caracteriza por un gradual agotamiento de los linfocitos T, fiebres recurrentes, pérdida de peso, múltiples infecciones oportunistas y por formas raras de neumonía y de cáncer asociadas al colapso del sistema inmunitario.

síndrome de Turner Situación genética en mujeres ocasionada por un genotipo 45,X (X0). Tienen fenotipo femenino, pero son estériles debido a ovarios poco desarrollados.

síndrome del *cri-du-chat* Síndrome clínico en la especie humana producida por una deleción de parte del brazo corto del cromosoma 5. Los bebes afectados tiene un quejido característico que suena como el de un gato.

síndrome del X frágil Trastorno genético ocasionado por la expansión de una repetición del trinucleótido CGG y un sitio frágil en Xq27.3 dentro del gen *FMR-1*. El síndrome del X frágil es la forma más común de retraso mental. Los varones afectados tienen rasgos faciales característicos y retraso mental. Las mujeres portadoras carecen de los síntomas físicos, pero como grupo tienen tasas más altas de retraso mental que los individuos normales.

sistema enzimático inducible Sistema enzimático bajo control de una molécula reguladora, o inductor, que bloquea un represor y permite la transcripción.

sistema enzimático reprimible Enzima o grupo de enzimas cuya síntesis está regulada por la concentración intracelular de ciertos metabolitos.
sitio activo Parte de una proteína, en general una enzima, cuya integridad estructural se requiere para su función (p.e., el sitio de unión al substrato de una enzima).
sitio de clonación múltiple (*polylinker*) Segmento de DNA construido para que contengan sitios múltiples para la digestión de enzimas de restricción. En general se encuentran en vectores modificados, como los plásmidos.
sitio regulador Secuencia de DNA implicada en el control de la expresión de otros genes, implicando normalmente una interacción con otra molécula.
snurps Véase *RNA nuclear pequeño.*
sonda Macromolécula de DNA o de RNA marcada, que puede detectarse mediante análisis autorradiográfico o mediante el microscopio de fluorescencia. Las sondas se utilizan para identificar moléculas diana, genes o productos génicos.
spliceosoma Complejo macromolecular nuclear en el que se producen las reacciones de corte y empalme para eliminar los intrones de los pre-mRNA.
SRY Región que determina el sexo del gen Y que se encuentra cerca del límite pseudoautosómico del cromosoma Y. Las pruebas acumuladas indican que este gen es el factor determinante de los testículos (TDF).
subespecie Población de una especie con cruzamiento libre y con características morfológicas o geográficas diferentes.
superdominancia Fenómeno en donde los heterozigotos tienen un fenotipo más extremo que cualquiera de los genotipos homozigotos.
superhembra Véase *metahembra.*
supermacho Véase *metamacho.*
supresión dominante Una forma de epistasia en la que un alelo dominante de un locus suprime el efecto de un alelo dominante de otro locus, dando lugar a una proporción fenotípica 13:3.
sustancia H Grupo carbohidrato presente en la superficie de los glóbulos rojos. Cuando no está modificado da lugar al tipo sanguíneo 0; cuando está modificado por la adición de monosacáridos da lugar a los tipos A, B y AB.
sustitución de base Cambio de una base en una molécula de DNA que produce una mutación. Hay dos tipos de sustituciones: las *transiciones*, en las que una purina sustituye a una purina o una pirimidina sustituye a una pirimidina; y las *transversiones*, en las que una pirimidina sustituye a una purina o viceversa.
tamaño poblacional efectivo Número de individuos de una población con igual probabilidad de contribuir con gametos a la generación siguiente.
tasa de mutación Frecuencia con la que aparecen mutaciones en un locus dado o en una población.
TDF (factor de la determinación de los testículos) El producto del gen *SRY*, del cromosoma Y, que controla el punto de decisión en el desarrollo para que una gónada no diferenciada se desarrolle en testículos.
telofase Fase de la división celular en la que los cromosomas hijos alcanzan los polos opuestos de la célula y se reconstituyen los núcleos. La telofase finaliza con la citocinesis.
telofase I En la primera división meiótica, cuando los cromosomas duplicados alcanzan los polos de las células en división.
telomerasa Enzima que añade secuencias de DNA cortas, repetidas en tándem, a los extremos de los cromosomas eucariotas.
telómero Cromómero terminal de un cromosoma.
teoría cromosómica de la herencia Idea propuesta independientemente por Walter Sutton y Theodore Boveri de que los cromosomas llevan genes y son la base del mecanismo mendeliano de la segregación y transmisión independiente.
teoría endosimbiótica Propuesta de que los orgánulos celulares autoreplicativos, como mitocondrias y cloroplastos, fueron originalmente organismos de vida libre que establecieron una relación simbiótica con células nucleadas.
terminalización Movimiento de los quiasmas hacia los extremos de los cromosomas en el diploteno de la primera división meiótica.
tétrada Las cuatro cromátidas que constituyen los cromosomas emparejados en la profase de la primera división meiótica. Las cuatro células haploides que se producen en una división meiótica.
tipo silvestre El fenotipo o genotipo más comúnmente observado, designado como norma o tipo.
T_m Véase *perfil de fusión.*
topoisomerasa Tipo de enzimas que convierten al DNA de una forma topológica a otra. Durante la replicación del DNA, estas enzimas facilitan el desenrollamiento de la estructura de doble hélice del DNA.
totipotente La capacidad de una célula o de parte de un embrión para generar todas las estructuras adultas. Normalmente, esta capacidad se va restringiendo de manera progresiva durante el desarrollo.
traducción Generación de la secuencia aminoacídica de un polipéptido a partir de la secuencia de bases de una molécula de mRNA en asociación con un ribosoma.
transcripción Transferencia de información genética del DNA mediante la síntesis de una molécula de RNA copiada de un molde de DNA.
transcriptoma Grupo de moléculas de mRNA presentes en la célula en un momento dado.
transdeterminación Cambio del destino de desarrollo de una célula o de un grupo de células.
transducción Transferencia de genes mediada por virus de una bacteria a otra, o la transferencia de genes en eucariotas mediada por retrovirus.
transducción abortiva Fenómeno en el que un DNA transducido no se incorpora en el cromosoma receptor. Véase *transducción.*
transducción especializada Transferencia genética sólo de genes específicos del huésped por fagos transductores.
transducción generalizada Transducción de cualquier gen en el genoma bacteriano por un fago.
transducción restrictiva Véase *transducción especializada.*
transferencia *northern* Técnica mediante la que una molécula de RNA se separa por electroforesis y se transfiere por acción capilar a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Hibridando con una sonda de ácido nucleico marcado, se pueden identificar moléculas de RNA específicas.
transferencia *Southern* Técnica desarrollada por Edward Southern en la que fragmentos de DNA producidos por la digestión con enzimas de restricción se separan por electroforesis y se transfieren por acción capilar a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Se pueden identificar fragmentos específicos de DNA mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico marcado.
transferencia *western* Técnica en la que se separan proteínas mediante una electroforesis en gel y se transfieren por acción capilar a una membrana de nylon o de nitrocelulosa. Puede identificarse una proteína específica mediante hibridación con un anticuerpo marcado.

transformación Cambio heredable en una célula u organismo conseguido por DNA exógeno.
transición Suceso mutacional en el que una purina es reemplazada por otra, o una pirimidina es reemplazada por otra.
translocación Mutación cromosómica asociada con la transferencia de un segmento cromosómico de un cromosoma a otro. También se utiliza para indicar el movimiento del mRNA a través del ribosoma durante la traducción.
translocación recíproca Aberración cromosómica en la que cromosomas no homólogos intercambian partes.
translocación Robertsoniana Un tipo de aberración cromosómica que implica la fusión de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos por el centrómero.
transmisión independiente Comportamiento independiente de cada pareja de cromosomas homólogos en su segregación en la meiosis I. La distribución al azar de los homólogos paternos y maternos en los gametos.
transposón no autónomo Elemento transponible que carece del gen funcional de la transposasa.
transversión Suceso mutacional en el que una purina es reemplazada por una pirimidina, o una pirimidina es reemplazada por una purina.
triploidía Situación en la que una célula u organismo tiene tres dotaciones haploides de cromosomas.
trisomía Situación en la que una célula u organismo tiene dos copias de cada cromosoma excepto de uno, del que hay presentes tres copias. Por consiguiente, la fórmula general de las trisomías es $2n + 1$.
tRNA Véase *RNA de transferencia*.
unidad de mapa Medida de la distancia genética entre dos genes, que corresponde a la frecuencia de recombinación del 1 por ciento. Véase *centimorgan*.
unidad del coeficiente de Svedberg (*S*) Unidad de medida de la tasa a la que las partículas (moléculas) sedimentan en un campo centrífugo. Esta unidad es función de varias propiedades fisicoquímicas, como el tamaño y la forma. Un valor de sedimentación de 1×10^{-13} seg. se define como una unidad del coeficiente de Svedberg.
valor *C* Cantidad haploide de DNA presente en el genoma.
variación continua Variación fenotípica que presentan los caracteres cuantitativos distribuidos desde un fenotipo extremo a otro de un modo continuo o solapado.
variación discontinua Datos fenotípicos que se clasifican en dos o más clases diferentes que no se solapan.
varianza Medida estadística de la variación de los valores respecto de un valor central, calculado como el cuadrado de la desviación típica.
varianza aditiva Varianza genética atribuible a la sustitución de un alelo por otro en un locus dado. Esta varianza se puede utilizar para predecir la tasa de respuesta a la selección fenotípica en caracteres cuantitativos.
variegación Manchas de fenotipo distinto, como de color, en un tejido.
vector de expresión Plásmidos o fagos que contienen regiones promotoras diseñadas para que las secuencias de DNA insertadas se expresen
vector En DNA recombinante, agente, como un fago o un plásmido, en el que se insertará un segmento de DNA foráneo.
viabilidad Medida del número de individuos de una clase fenotípica dada que sobrevive, respecto de otra clase (normalmente el tipo silvestre).
vigor híbrido Superioridad de un heterozigoto sobre el homozigoto para un carácter dado.
virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) Retrovirus humano asociado al inicio y a la progresión del SIDA. Véase *síndrome de la inmunodeficiencia adquirida*.
VNTR Véase *repeticiones en tándem de número variable*.
XIST Locus del centro de inactivación del cromosoma X que puede controlar la inactivación del cromosoma X en las hembras de mamíferos.
YAC Vector de clonación en forma de cromosoma artificial de levadura, construido utilizando elementos cromosómicos como telómeros (de un ciliado), centrómeros, orígenes de replicación y genes marcadores de levadura. Los YAC se utilizan para clonar segmentos largos de DNA eucariota.
zeína Principal proteína de almacenamiento en el endospermo de maíz, formada por dos proteínas principales, con unos pesos moleculares de 19.000 y 21.000 Da.
zigoteno Estadio de la profase I de la meiosis en la que los cromosomas homólogos sufren sinapsis y se emparejan en toda su longitud formando bivalentes. El complejo sinaptinémico se forma en este estadio.
zigoto Célula diploide que se produce por fusión de núcleos de gametos haploides.

Apéndice B

Respuesta a problemas seleccionados

Capítulo 1

2. Basándonos en el paralelismo entre el modelo de herencia mendeliano y el comportamiento de los cromosomas, surge la teoría cromosómica de la herencia. Afirma que la herencia de los caracteres está controlada por genes que residen en los cromosomas que se transmiten por lo gametos.

4. Una variante génica se denomina alelo. En una población puede haber muchas de tales variantes, pero, para un organismo diploide, sólo dos de tales alelos pueden existir en un individuo dado.

6. Los *genes*, que son secuencias lineales de nucleótidos, normalmente ejercen su influencia produciendo proteínas mediante los procesos de transcripción y traducción. Los genes son las unidades funcionales de la herencia. A veces se asocian con proteínas para formar *cromosomas*.

8. El dogma central de la genética molecular se refiere a las relaciones entre el DNA, RNA y proteínas. Los procesos de *transcripción* y *traducción* son esenciales para comprender estas relaciones.

10. Las enzimas de restricción (endonucleasas) cortan el DNA de doble cadena en secuencias de bases concretas. Cuando un vector es cortado por la misma enzima, se originan extremos complementarios de tal manera que tales extremos, independientemente de su origen, se pueden combinar y ligar para formar una estructura de doble cadena intacta. Tales formas recombinantes se usan a menudo en empeños industriales de investigación y/o farmacéuticos.

12. Los que apoyan la patente de los organismos arguyen que es necesario para estimular la innovación y permitir que se recuperen los costes del descubrimiento. Los inversores de capital asumen que hay una probabilidad de que su inversión produzca retornos positivos. Otros arguyen que las sustancias naturales no deberían pertenecer a nadie y que una vez en poder de unas pocas compañías, suprimirían la libertad de empresa. Los individuos y las compañías que necesiten productos vitales, pero patentados, puede tener un acceso limitado.

14. Los organismos modelo no sólo son útiles, sino necesarios para entender a los genes que influyen en las enfermedades humanas. Dado que los sistemas genético/moleculares están muy conservados a lo largo de muchas líneas filogenéticos, lo que se aprende de un organismo normalmente se aplica a todos los organismos. Muchos organismos modelo tienen peculiaridades, como un fácil cultivo, información genética o muchos descendientes, que los hace directa y especialmente informativos en estudios genéticos.

Capítulo 2

2. Los cromosomas que son homólogos comparten muchas propiedades, como

Longitud total
Posición del centrómero
Patrón de bandas
Tipo y localización de los genes
Patrón autorradioagráfico

La *diploidía* es un término que se usa a menudo junto con el símbolo $2n$. Significa que se encuentran los dos miembros de las parejas de cromosomas homólogos. El cambio de diploide ($2n$) a haploide (n) se produce en la *división reduccional*, cuando las tétradas se convierten en diadas en la meiosis I.

6. El centrómero se puede situar en medio (metacéntrico), alejado del medio (submetacéntrico), cerca de un extremo (acrocéntrico) o en un extremo (telocéntrico). Advierta las diferentes formar de los cromosomas en la anafase cuando se desplazan hacia los polos: metacéntrico (a), submetacéntrico (b), acrocéntrico (c), telocéntrico (d).



8. Lea cuidadosamente la sección sobre mitosis y división celular del texto. Las partes importantes del ciclo celular son la interfase y la mitosis. La interfase está compuesta de cuatro fases: G1, G0, S y G2. En la fase S se duplica el DNA cromosómico. La cariocinesis implica división del núcleo mientras que la citocinesis se refiere a la división del citoplasma.

10. Comparada con la mitosis, que mantiene una constancia cromosómica, la meiosis reduce el número de cromosomas y proporciona una oportunidad para el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos. En la mitosis no hay cambio del número o del tipo de cromosomas en las dos células hijas, mientras que en la meiosis se producen numerosas células haploides (n) potencialmente diferentes.

12. Las cromátidas hermanas son genéticamente idénticas, excepto cuando se pueden producir mutaciones durante la replicación del DNA. Las cromátidas no hermanas son similares genéticamente si se encuentran en los cromosomas homólogos o diferentes genéticamente si se encuentran en cromosomas no homólogos. Si se produce entrecruzamiento, entonces las cromátidas unidas por el mismo centrómero ya no serán idénticas.

14. No necesariamente. Si el entrecruzamiento ocurrió en la meiosis I, entonces las cromátidas del oocito secundario no son idénticas. Una vez que se han separado en la Meiosis II, hay cromátidas diferentes en la oótida y en el corpúsculo polar secundario.

16. A través de la transmisión independiente de los cromosomas en la anafase I de la meiosis, las células hijas (espermatocitos y oocitos secundarios) pueden tener dotaciones diferentes de cromosomas de origen paterno y materno. El entrecruzamiento, que sucede con mucha mayor frecuencia en la meiosis que en la mitosis, permite que los cromosomas de origen materno y paterno intercambien segmentos incrementando por ello la probabilidad de que las células hijas sean variables.

18. Si hay ocho combinaciones posibles en la parte (c) del problema anterior, con la adición de otro par de cromosomas habría 16 combinaciones.

20. La mitad de cada tétrada tendrá un homólogo materno: $(1/2)^{10}$.

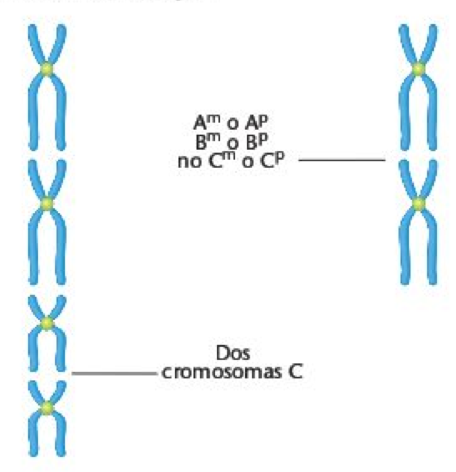
22. En las angiospermas, la meiosis da lugar a la formación de microsporas (masculinas) y macrosporas (femeninas), que dan lugar al estadio de gametófito haploide masculino y femenino. Los micro- y macrogametófitos producen el polen y los óvulos, respectivamente. Después de la fecundación se forma el esporófito.

24. El modelo de fibra plegada se basa en que cada cromátida consta de una sola fibra enrollada como una madeja de hilo. Cada fibra consta de DNA y proteínas. El proceso de enrollamiento se produce durante la transición de la cromatina interfásica a cromosomas más condensados en las profases de la mitosis y la meiosis. Tal condensación conduce a una contracción de unas 5.000 veces la longitud del DNA dentro de cada cromátida.

26. Cromosomas duplicados A^m, A^p, B^m, B^p, C^m y c^p se alinearan en la metafase, con los centrómeros divididos y las cromátidas hermanas yendo a los polos opuestos en la anafase.

28. Siempre que haya contado ocho combinaciones posibles en el problema anterior, no habrá que añadir nuevas combinaciones en este problema.

30. Vea los productos de la no disyunción del cromosoma C al final de la meiosis I como sigue.



Al final de la meiosis II, asumiendo, como el problema indica, que los cromosomas C se separan como diadas en lugar de cómo mónadas en la meiosis II, tendría mónadas para los cromosomas A y B y diadas (de la célula de la izquierda) para ambos cromosomas C como una posibilidad.

Capítulo 3

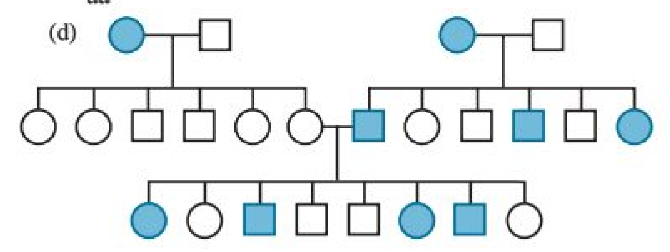
2. Ya que el albinismo se hereda como un carácter recesivo, los genotipos *AA* y *Aa* darían lugar a un fenotipo normal, mientras que *aa* sería albino.

(a) Los padres deben ser ambos heterozigotos (*Aa*).

(b) La mujer tiene que ser *aa*. Ya que todos los hijos son normales, se tiene que considerar que el varón es *AA* en lugar de *Aa*. No obstante, el varón podría ser *Aa*. En este caso, la probabilidad de tener seis hijos normales sería 1/64.

(c) La mujer tiene que ser *aa*. El hecho de que la mitad de los hijos sean normales y la mitad albinos indica un «cruce prueba» típico, en donde el varón *Aa* se cruza con la mujer *aa*

(d)



La proporción 1:1 de albino respecto de normal en la última generación se produce teóricamente porque la madre es *Aa* y el padre *aa*.

4. Primero, los organismos tienen **factores** para varios caracteres. Segundo, si estos **factores se encuentran formando parejas**, existe la posibilidad de que algunos organismos se conviertan en «razas puras» si son homozigotos, mientras que otros no (heterozigotos). Si un «factor» de un par tuviera una **influencia dominante** sobre el otro, entonces se podría explicar cómo dos organismos, pareciendo lo mismo, pudieran se diferentes genéticamente (homozigotos o heterozigotos).Tercero, si los **elementos emparejados se separan (segregan)** en la formación de los gametos y si los gametos se combinan al azar, se podrían explicar las proporciones 3:1 en los cruces monohíbridos. El cuarto postulado, la transmisión independiente, no se puede demostrar en los cruces monohíbridos porque para hacerlo tienen que estar implicados dos pares de genes.

6. P = ajedrezados; p = lisos. Al ajedrezado se le asigna una supuesta función dominante porque en un examen casual de los datos, especialmente del cruce (b), vemos que es más probable que se produzcan los tipos ajedrezados que los tipos lisos.

Cruce (a): $PP \times PP$ o $PP \times Pp$

Cruce (b): $PP \times pp$

Cruce (c): Debido a que todos los descendientes de este cruce son lisos, no hay duda de que el genotipo de ambos padres es pp.

Los genotipos de todos los individuos:

	Descendencia F_1	
Cruce P_1	***Ajedrezado***	***Liso***
(a) $PP \times PP$	PP	
(b) $PP \times pp$	Pp	
(c) $pp \times pp$		pp
(d) $PP \times pp$	Pp	
(e) $Pp \times pp$	Pp	pp
(f) $Pp \times Pp$	PP, Pp	pp
(g) $PP \times Pp$	PP, Pp	

8. $WWgg = 1/16$

10. En el Problema #9, (d) encaja con esta descripción.

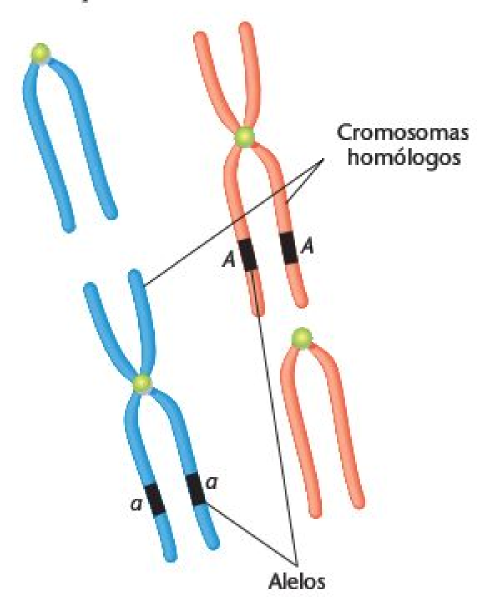
12. Los cuatro postulados de Mendel están relacionados con el esquema de abajo.

(1) Los factores se dan en parejas. Advierta *A* y *a*.

(2) Algunos genes tienen alelos dominantes y recesivos. Advierta *A* y *a*.

(3) Los alelos segregan en la formación de los gametos. Cuando los cromosomas homólogos se separan en la anafase I, los alelos irán a los polos opuestos del aparato meiótico.

(4) Un par de genes se separa independientemente de los otros pares de genes. Pares de genes diferentes en la misma pareja de cromosomas homólogos (si están alejados) o en cromosomas no homólogos se separarán independientemente de cualquier otro en la meiosis.



14. La homozigosis se refiere a una situación en donde ambos genes de un par son idénticos (p.e., *AA* o *GG* o *hh*), mientras que la heterozigosis se refiere a la situación en donde los miembros de un par génico son diferentes (p.e., *Aa* o *Vv* o *Bb*).

16. La fórmula general para determinar el número de tipos de gametos producidos por un organismo es 2^n, siendo *n* el número de parejas *heterozigotas*.

(a) 4: *AB*, *Ab*, *aB*, *ab*

(b) 2: *AB*, *aB*

(c) 8: *ABC*, *ABc*, *AbC*, *Abc*, *aBC*, *aBc*, *abC*, *abc*

(d) 2: *ABc*, *aBc*

(e) 4: *ABc*, *Abc*, *aBc*, *abc*

(f) $2^5 = 32$

18. *V* = semillas amarillas; *v* = semillas verdes.

	Fenotipos	**Genotipos**
P_1:	amarillo × verde	*VV* × *vv*
F_1:	todas amarillas	*Vv*
F_2:	6.022 amarillas	1/4 *VV*; 2/4 *Vv*
	2.001 verdes	1/4 *vv*

Advierta que de los *descendientes* F_2 *amarillos*, 1/3 son *VV* y 2/3 son *Vv*. Si se permite la autofecundación de los tipos *VV*, entonces todos los descendientes (los 166) se comportarán como raza pura, mientras que los otros (353 que son *Vv*) producirán descendencia en la proporción 3:1 cuando se autofecunden.

VV × *VV* = todos *VV*

Vv × *Vv* = 1/4 *VV*; 2/4 *Vv*; 1/4 *vv*

20. Símbolos:

Forma de la semilla	**Color de la semilla**
R = redonda	*V* = amarillo
r = rugosa	*v* = verde

P_1: *RRvv* × *rrVV*

F_1: *RvVv* se cruza con *rrvv*

(que es el cruce prueba típico)

Los descendientes se distribuirán en una típica 1:1:1:1,

1/4 *Rr Vv* (redonda, amarilla)

1/4 *Rr vv* (redonda, verde)

1/4 *rr Vv* (rugosa, amarilla)

1/4 *rr vv* (rugosa, verde)

22. (a) $\chi^2 = 0{,}064$

valor de probabilidad (p) entre 0,9 y 0,5. Por consiguiente, podríamos decir que hay un «buen acuerdo» entre los valores observados y los esperados.

(b) $\chi^2 = 0{,}39$

El valor de *p* en la tabla para 1 grado de libertad se encuentra todavía entre 0,9 y 0,5. La desviación en cada caso se puede atribuir al azar.

24. Para la prueba de una proporción 3:1, el valor de χ^2 es 33,3 con un valor de *p* asociado de menos de 0,01 para 1 grado de libertad. Para la prueba de una proporción 1:1, el valor de χ^2 es 25, de nuevo con un valor de *p* asociado de menos de 0,01 para 1 grado de libertad. Basándonos en estos valores de probabilidad, se tiene que rechazar la hipótesis nula.

26. Si un gen es dominante, no saltará generaciones ni pasará a los descendientes, a menos que los padres tengan el gen. Por otro lado, los genes que son recesivos pueden saltar generaciones y existir en estado de portador en los padres. Advierta que II-4 y II-5 tienen una hija (III-4) afectada. Sólo con este hecho, el gen tiene que considerarse recesivo. Nota: si un gen es recesivo y ligado al X (se discutirá más tarde), el patrón será a menudo de varón afectado a mujer portadora a varón afectado.

I-1 (*Aa*), I-2(*aa*), I-3(*Aa*), I-4(*Aa*)

II-1 (*aa*), II-2(*Aa*), II-3(*aa*), II-4(*Aa*), II-5(*Aa*),

II-6 (*aa*), II-7(*AA* o *Aa*), II-8(*AA* o *Aa*)

III-1 (*AA* o *Aa*), III-2(*AA* o *Aa*), III-3(*AA* o *Aa*),

III-4(*aa*), III-5(probablemente *AA*), III-6(*aa*)

IV-1 hasta IV-7, todos *Aa*.

28. 1/8

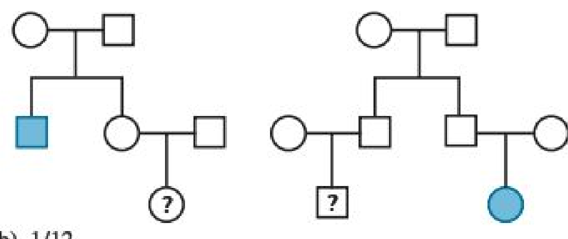
30. 3/4

32. 4/9

34. 1/9

36. $P = [8!(3/4)^6(1/4)^2]/6!2!$

38. **(a)**



(b) 1/12

(c) 6/12
(d) 5/12

40. $P = [5!(3/4)^3(1/4)^2]/3!2! = 135/512$

42. (a) Para el grupo I, el $\chi^2 = 2{,}15$, con p entre 0,2 y 0,05. Por lo que se podría aceptar la hipótesis nula de que no hay diferencias significativas entre los valores observados y esperados.
Para el grupo II, el $\chi^2 = 21{,}43$ y $p < 0{,}001$. Se podría rechazar la hipótesis nula y asumir una diferencia significativa entre los valores observados y esperados.
(b) En muchos casos se obtiene más confianza cuando el tamaño de la muestra aumenta, sin embargo, dependiendo del organismo o experimento, hay unos límites prácticos del tamaño de la muestra.

Capítulo 4

2. Con *dominancia incompleta* se puede ver más como un fenómeno cuantitativo, en donde el heterozigoto es intermedio (aproximadamente) entre los dos homozigotos. La *codominancia* se puede ver de una manera más cualitativa, en donde ambos alelos se expresan en el heterozigoto.

4. Cruce 1:

cola corta × cola normal larga →
aproximadamente 1/2 corta, 1/2 larga

Esto le indica que un tipo es heterozigoto y el otro homozigoto.
Cruce 2:
cola corta × cola corta →
6 cola corta, 3 cola larga (2/3 corta, 1/3 larga)

En este punto se consideraría que los 2/3 de cola *corta* son heterozigotos y los de cola *larga* son la clase homozigota. Además, las cortas son dominantes sobre las largas. Ya que estas proporciones se repitieron y comprobaron, se puede concluir que la proporción 2:1 no es un artefacto estadístico y que se mantendría el siguiente modelo genotípico. Ya que largo es lo «normal», no significa que sea dominante.
Símbolos:
S = corta, s = larga
Cruce 1:
$Ss \times ss$ →
1/2 Ss (corta), 1/2 ss (larga)
Cruce 2:
$Ss \times Ss$ →
1/4 SS(letal), 2/4 Ss(corta), 1/4 ss(larga)

6. $I^AI^O \times I^BI^O$

	I^B	I^O
I^A	$I^A I^B$(AB)	$I^A I^O$(A)
I^O	$I^B I^O$(B)	$I^O I^O$(O)

La proporción sería 1(A):1(B):1(AB):1(0).

8. Símbolos:
Se = secretor se = no secretor
$I^AI^B\ Sese \times I^OI^O\ Sese$

(a)

	I^OSe	I^Ose
$I^A\ Se$	A, secretor	A, secretor
$I^A\ se$	A, secretor	A, no secretor
$I^B\ Se$	B, secretor	B, secretor
$I^B\ se$	B, secretor	B, no secretor

Proporción global: 3/8 A, secretor
1/8 A, no secretor
3/8 B, secretor
1/8 B, no secretor

(b) 1/4 de todos los individuos tendrá el tipo sanguíneo 0.

10. (a) Fenotipos:
Himalaya × Himalaya ⇒ albino
Genotipos: $c^hc^a \times c^hc^a \Rightarrow c^ac^a$
Los padres Himalaya tienen que ser heterozigotos para producir descendencia albina.
Fenotipos:
color normal × albino ⇒ chinchilla
Genotipos $Cc^{ch} \times c^ac^a \Rightarrow c^{ch}c^a$
Por consiguiente, el cruce albino con chinchilla sería como sigue:
$c^ac^a \times c^{ch}c^a$ →
1/2 chinchilla; 1/2 albino
(b) Fenotipos:
albino × chinchilla ⇒ albino
Genotipos $c^ac^a \times c^{ch}c^a \Rightarrow c^ac^a$
Fenotipos:
color normal × albino ⇒ color normal
Genotipos $C_ \times c^ac^a \Rightarrow Cc^a$
Es imposible determinar el genotipo completo del padre de color normal, pero los descendientes con color normal tienen que ser como se indica, Cc^a.
Por consiguiente, el cruce de albino con color sería como sigue:
$c^ac^a \times Cc^a$ →
1/2 color normal; 1/2 albino
(c) Fenotipos:
chinchilla × albino ⇒ Himalaya
Genotipos: $c^{ch}c^h \times c^ac^a \Rightarrow c^hc^a$
El padre chinchilla tiene que ser heterozigoto para Himalaya, ya que tiene descendientes Himalaya.
Fenotipos:
color normal × albino ⇒ Himalaya
Genotipos: $Cc^h \times c^ac^a \Rightarrow c^hc^a$
Por consiguiente, un cruce entre dos tipos Himalaya daría la siguiente descendencia:
$c^hc^a \times c^hc^a$
⇓
3/4 Himalaya; 1/4 albino

12. 18/64

14. (a) $C^{ch}C^{ch}$ = castaño
C^cC^c = cremello
$C^{ch}C^c$ = palomino

(b) La F_1 que resulta de los cruces entre caballos cremello y castaño se esperaría que fuera toda palomino. En F_2 se esperaría una proporción 1:2:1, como en el tercer cruce de la parte (a) de arriba.

16. (a) En un cruce de

$$AACC \times aacc$$

los descendientes serán todos *AaCc* (agutí), ya que el alelo *C* permite que el pigmento se deposite en el pelo y cuando está será agutí. Los descendientes F_2 tendrán los siguientes genotipos «simplificados», con los correspondientes fenotipos:

$A_C_$ = 9/16 (agutí)
A_cc = 3/16 (sin color, ya que *cc* es epistático sobre *A*)
$aaC_$ = 3/16 (negro)
aacc = 1/16 (sin color, ya que *cc* es epistático sobre *aa*)

Las dos clases sin color no se distinguen fenotípicamente, por lo que la proporción final es 9:3:4.

(b) Los resultados de los cruces de hembras agutí

$$(A_C_) \times aacc \text{ (machos)}$$

se dan en tres grupos:

(1) Para producir un número igual de descendientes agutí y blancos, la hembra tenía que haber sido *AACc*, por lo que la mitad de los descendientes podrán depositar pigmento debido a *C*, y cuando lo hagan, serán todos agutí (ya que han recibido de la hembra sólo *A*).

(2) Para producir un número igual de descendientes agutí y negros, la madre tiene que haber sido *Aa* y como no se han producido descendientes sin color, también tiene que haber sido *CC*. Su genotipo tiene que haber sido *AaCC*.

(3) Advierta que la mitad de los descendientes son blancos, por consiguiente la hembra tiene que haber sido *Cc*. La mitad de los descendientes pigmentados son negros y la otra mitad agutí, por consiguiente la hembra tiene que haber sido *Aa*. En conjunto, el genotipo *AaCc* parece el apropiado.

18. (a) $AaBbCc \Rightarrow$ gris (*C* permite pigmento)
(b) $A_B_C_ \Rightarrow$ gris (*C* permite pigmento)
(c) 16/32 albino;
9/32 gris;
3/32 amarillo;
3/32 negro;
1/32 crema
(d) 9/16 (gris)
3/16 (negro)
4/16 (albino)
(d) 3/8 (gris)
1/8 (amarillo)
4/8 (albino)

20. (a) Cruce A:
P_1: *AABB* × *aaBB*
F_1: *AaBB*
F_2: 3/4 A_BB:1/4 *aaBB*
Cruce B:
P_1: *AABB* × *AAbb*
F_1: *AABb*
F_2: 3/4 $AAB_$:1/4 *AAbb*
Cruce C
P_1: *aaBB* × *AAbb*
F_1: *AaBb*
F_2: 9/16 $A_B_$:3/16 A_bb:3/16 $aaB_$:1/16 *aabb*:

(b) El genotipo del individuo P_1 desconocido sería *AAbb* (marrón), mientras que la F_1 sería *AaBb* (verde)

22. (a) Asigne los fenotipos como se dan, luego vea si aparecen los patrones.

$A_B_$ = 9/16 (amarillo)
A_bb = 9/16 (azul)
$aaB_$ = 9/16 (rojo)
aabb = 9/16 (malva)

Vea que cada tipo puede ser homozigoto. Si se cruzan plantas con flores azules (homozigotas) con homozigotos de flores rojas, las plantas F_1 tendrán flores amarillas. Si las plantas de flores amarillas se cruzan con plantas de flores malva, las plantas F_1 serán amarillas y en la F_2 aparecerá una proporción 9:3:3:1. Todas las observaciones encajan con el modelo propuesto.

(b) Si se cruza una planta roja de raza pura (*aaBB*) con una malva (*aabb*), la F_1 sería roja (*aaBb*). La F_2 sería como sigue:

aaBb × *aaBb* →
3/4 $aaB_$ (roja): 1/4 *aabb* (malva)

24. (a) 1/4
(b) 1/2
(c) 1/4
(d) cero

26. Símbolos: Márgenes del ala normales = sd^+; irregulares = *sd*

(a) P_1: $X^{sd}X^{sd} \times X^+/Y$ →
F_1: 1/2 X^+X^{sd} (hembra normal)
1/2 X^{sd}/Y (macho irregular)
F_2: 1/4 X^+X^{sd} (hembra normal)
1/4 $X^{sd}X^{sd}$ (hembra irregular)
1/4 X^+/Y (macho normal)
1/4 X^{sd}/Y (macho irregular)

(b) P_1: $X^+/X^+ \times X^{sd}/Y$ →
F_1: 1/2 X^+X^{sd} (hembra normal)
1/2 X^+/Y (macho normal)
F_2: 1/4 X^+X^+ (hembra normal)
1/4 X^+X^{sd} (hembra normal)
1/4 X^+/Y (macho normal)
1/4 X^{sd}/Y (macho irregular)

Si el gen *scalloped* no estuviera ligado al X, entonces todos los descendientes F_1 serían silvestres (fenotípicamente) y en F_2 se produciría una proporción de normal:irregular 3:1.

28. P1: X^+X^+; *su-v/su-v* × X^v/Y; $su\text{-}v^+/su\text{-}v^+$
F_1: 1/2 X^+X^v; $su\text{-}v^+/su\text{-}v$ (hembra normal)
1/2 X^+/Y; $su\text{-}v^+/su\text{-}v$ (macho normal)

F_2: 2/4 hembras, $X^+/_$ → 3/4 $su\text{-}v^+/_$; 1/4 *su-v/su-v*
1/4 machos, X^+/Y → 3/4 $su\text{-}v^+/_$; 1/4 *su-v/su-v*
1/4 machos, X^v/Y → 3/4 $su\text{-}v^+/_$; 1/4 *su-v/su-v*

8/16 hembras silvestres;(ninguna de las hembras es homozigota para el gen *vermilion*)

5/16 machos silvestres; (4/16 que no tienen el gen *vermilion* y 1/16 que tienen el gen *vermilion* en hemizigosis, pero suprimido por *su-v/su-v*)

3/16 machos bermellón; (sin supresión del gen *vermilion*)

30. (a) $w/w; se^+/se^+ \times w^+/Y; se/se$

$\Downarrow$

F_1: $w^+/w; se^+/se$ = hembras silvestres
$w/Y; se^+/se$ = machos con ojos blancos

F_2: 3/16 machos silvestres
4/16 machos blancos
1/16 machos sepia
3/16 hembras silvestres
4/16 hembras blancos
1/16 hembras sepia

(b) $w^+/w^+; se/se \times w/Y; se^+/se^+$

$\Downarrow$

F_1: $w^+/w; se^+/se$ = hembra silvestres
$w^+/Y; se^+/se$ = machos silvestres

F_2: 3/16 machos silvestres
4/16 machos blancos
1/16 machos sepia
6/16 hembras silvestres
2/16 hembras sepia

32. Represente *a* al gen mutante y *A* a su alelo normal.

(a) Esta genealogía está de acuerdo con un carácter recesivo ligado al X, porque el macho contribuiría con un cromosoma X que lleva la mutación *a* a la hija *aa*. La madre tendría que ser heterozigota *Aa*.

(b) Esta genealogía está de acuerdo con una carácter recesivo ligado al X, porque la madre podría ser *Aa* y transmitir su alelo *a* a su hijo (*a*/Y) y su alelo *A* a su otro hijo.

(c) Esta genealogía no está de acuerdo con un modo de herencia ligado al X, porque la madre *aa* tiene un hijo *A*/Y.

34. F_1:todos con plumaje de gallina.
F_2:todos los descendientes tendrían plumaje de gallina excepto 1/8 que serían machos con plumaje de gallo.

36. La expresión fenotípica depende del genoma del organismo, del ambiente inmediato molecular y celular del genoma y de numerosas interacciones entre un genoma, el organismo y el ambiente.

38. La *anticipación* ocurre cuando un trastorno hereditario presenta una aparición progresivamente más temprana y un aumento de la gravedad en generaciones sucesivas. La *impronta* ocurre cuando la expresión fenotípica está influenciada por el origen paterno del cromosoma que lleva un gen particular.

40. A primera vista parecería estar de acuerdo con una proporción 9:7; sin embargo, los fenotipos tendrían que estar invertidos para que el resultado encajara. Por consiguiente, se tiene que considerar una explicación alternativa. Una proporción 27:9:9:9:3:3:3:1 encaja muy bien con que *A_B_C_* sea púrpura y cualquier combinación con homozigotos recesivos de blanco. Así una proporción 27(púrpura):37(blanco) encaja muy bien. Para comprobar esta hipótesis se podría tomar la F_1 púrpura y cruzarla con una tipo puro (*aabbcc*) blanco. Tal cruce daría 1(púrpura): 7(blanco).

42. (a) Ya que el denominador en las proporciones es 64, se debería considerar en principio que en este problema hay tres pares de genes que se transmiten independientemente. Sin embargo, debido a que solo hay dos características (color del ojo y croar), se podría hipotetizar que hay dos pares de genes implicados en la herencia de un carácter y un tercer par implicado en el otro carácter.

(b) Advierta que hay una proporción 48:16 (3:1) de rib-it respecto de ni-dip y una proporción de 36:16:12 (9:4:3) de ojos de color azul, verde o púrpura. Debido a estas relaciones se podría concluir que el croar se debe a un par de genes (dominante/recesivo) mientras que el color del ojo se debe a dos pares de genes. Ya que hay una proporción 9:4:3 en cuanto al color de los ojos, tiene que haber alguna interacción génica (epistasia).

(c,d) Símbolos:
Croar: *R_* = rib-it; *rr* = ni-dip
Color del ojo:
Ya que el fenotipo más frecuente es el color azul, representemos con *A_B_* su genotipo. Para la clase púrpura, «un grupo de 3/16», utilizaremos el genotipo *A-bb*. La clase «4/16» (verde) tendría los genotipos *aaB_* y *aabb*.

(e) Los cruces entre una rana de ojos azules, ni-dip con una rana de ojos púrpura, rib-it, tendrían los genotipos

AABBrr × *AAbbRR*

que daría lugar a una F_1 *AABbRr*, con ojos azules y rib-it. La F_2 seguiría un patrón 9:3:3:1 debido a la homozigosis del locus *A* y la heterozigosis de los loci *B* y *R*.

9/16 *AAB-R-* = ojos azules, rib-it
3/16 *AAB-rr* = ojos azules, ni-dip
3/16 *AAbbR-* = ojos púrpura, rib-it
1/16 *AAbbrr* = ojos púrpura, ni-dip

(f) Los distintos resultados pueden aparecer debido a la posible variedad genética en producir ranas con ojos verdes. Ya que no hay dependencia del locus *B*, los siguientes genotipos pueden definir el fenotipo verde:

aaBB, aaBb, aabb

(g) Advierta que la proporción de ranas con ojos púrpura y con ojos verdes es 3:1, por consiguiente esperamos que los padres sean heterozigotos para el locus *A*. Debido a que la proporción entre rib-it y ni-dip es también de 3:1, esperamos que los padres sean heterozigotos para el locus *R*. El locus *B* tendría el genotipo *bb* ya que ambos padres tiene los ojos púrpura como se indica en el problema. Por consiguiente, ambos padres sería *AabbRr*.

44. (a) P_1: *YYBB* × *yWbb*
F_1: *YyBb* y *YWBb*
Cruzando estos individuos F_1 obtendremos las proporciones observadas en F_2.

(b) Dado un macho azul con el genotipo *yyBb* y una hembra verde con el genotipo *YWBb*, los descendientes serán como se indica en la parte (b) de la pregunta.

46. Dados los siguientes genotipos de los padres:

aabb = carmesí
AABB = blanco

la F_1 tendrá el genotipo *AaBb* con fenotipo rosa.

En F_2 los genotipos siguientes se corresponden con los fenotipos dados:

*AAB_* = blanco	4/16
AaBB = magenta	2/16
AaBb = rosa	4/16
Aabb = naranja	2/16
aaBb = amarillo	1/16
aaBb = amarillo pálido	2/16
aabb = carmesí	1/16

48. (a) El término *pleiotropía* se utiliza cuando un solo gen presenta manifestaciones fenotípicas múltiples. (b) Cada respuesta fenotípica es el resultado de la incapacidad de los glóbulos rojos a suministrar adecuadamente a los tejidos oxígeno. La hemoglobina falciforme no puede transportar adecuadamente el oxígeno y la forma en hoz de los glóbulos rojos bloquea su paso a varios tejidos. Como consecuencia de las oclusiones de los vasos, se produce necrosis de los tejidos y una serie de problema de salud. (c) La base molecular de la anemia falciforme es la sustitución de una valina por el ácido glutámico en la posición 6 de la cadena β.

Capítulo 5

2. Primero, a fin de que los cromosomas se impliquen en el entrecruzamiento, deben estar próximos. Es probable que el apareamiento que se produce en la sinapsis sea la primera vez que en el ciclo celular los cromosomas alcanzan la proximidad necesaria. Segundo, los quiasmas son visibles en la profase I de la meiosis y es probable que estas estructuras estén íntimamente relacionadas con el entrecruzamiento.

4. Ya que el entrecruzamiento ocurre en la fase de cuatro filamentos del ciclo celular (es decir, después de la fase S) cada entrecruzamiento implica a sólo dos de las cuatro cromátidas.

6. La interferencia se explica a menudo por la rigidez física de las cromátidas de tal manera que es improbable que adquieran ángulos suficientemente agudos como para permitir que los recombinantes estén íntimamente cercanos.

8. *dp* - - - - *cl* - *ap*

3 *mu.* 39 *mu.*

10. Los fenotipos más frecuentes en la descendencia, los paternos, son coloreados, verdes (88) e incoloros, amarillos (92). Esto indica que los padres heterozigotos del cruce prueba es la pareja

$$RY/ry \times ry/ry$$

con los dos genes dominantes en un cromosoma y los dos recesivos en el homólogo. Viendo que hay 20 descendientes recombinantes entre 200, ó 20/200, la distancia de mapa sería de 10 unidades (20/200 × 100 para convertirlo en porcentajes) entre los loci *R* e *Y*.

12. Las clases más frecuentes son *PZ* y *pz*. Estas clases representan a los grupos paternos (no recombinantes) que indican que la disposición paterna original en el cruce prueba fue

$$PZ/pz \times pz/pz$$

Sumando los porcentajes de recombiantes (6,9 + 7,1) nos da un 14%, que sería la distancia de mapa entre los dos genes.

14.

	hembra A:	*hembra* B:	*Frecuencia:*
NR	3, 4	7, 8	primero
RS	1, 2	3, 4	segundo
RS	7, 8	5, 6	tercero
DR	5, 6	1, 2	cuarto

Las clases recombinantes sencillas, que representan recombinaciones entre los genes que están más próximos (*d-b*), se darían en menor frecuencia que las clases recombinantes entre genes más distantes (*b-c*)

16. (a) $y\,w+/++\,ct \times y\,w+/Y$
(b) *y*- - - - *w* - *ct*
0.0 1.5 20.0

(c) Habrá

$$0{,}185 \times 0{,}015 \times 1.000 = 2{,}775$$

doble recombiantes esperados

(d) Debido a que el cruce de los machos F_1 incluye al gen normal (tipo silvestre) para *cut wings,* no sería posible determinar inequívocamente el genotipo de todas las clases fenotípicas de F_2.

18. Indique el genotipo de los padres en el cruce original y en el recíproco. Utilice el punto y coma para indicar que están implicadas dos parejas de cromosomas distintas.

P_1: hembras: $+/+;\quad p\,e/p\,e$
×
machos: $dp/dp;\ ++/++$

F_1: hembras: $+/dp;\ ++/p\,e$
×
machos: $dp/dp;\ p\,e/p\,e$

0,20 tipo silvestre
0,05 *ebony*
0,05 *pink*
0,20 *pink, ebony*
0,20 *dumpy*
0,05 *dumpy, ebony*
0,05 *dumpy, pink*
0,20 *dumpy, pink, ebony*

Para el cruce recíproco

0,25 tipo silvestre
0,25 *pink, ebony*
0,25 *dumpy*
0,25 *dumpy, pink, ebony*

Los resultados cambian, ya que en los machos no hay entrecruzamiento.

20. (a,b) $+bc/a++$

$$a - b = \frac{32 + 38 + 0 + 0}{1{,}000} \times 100$$
$$= 7 \text{ unidades de mapa}$$

$$b - c = \frac{11 + 9 + 0 + 0}{1{,}000} \times 100$$
$$= 2 \text{ unidades de mapa}$$

(c) Los fenotipos de la descendencia que faltan son $++c$ y $a\,b+$, los cuales, de 1.000 descendientes, se esperarían 1,4 ($0{,}07 \times 0{,}02 \times 1.000$). Quizás por azar o por algún otro factor selectivo desconocido, no se observaron.

22. Ya que las cromátidas hermanas son genéticamente idénticas (con la excepción de raras mutaciones nuevas) el entrecruzamiento entre las hermanas no proporciona un aumento de variabilidad genética. La variabilidad genética individual podría generarse por entrecruzamiento somático porque ciertas manchas en el individuo serían diferentes genéticamente de otras regiones. Esta variabilidad sería con toda probabilidad la única consecuencia menor. El entrecruzamiento somático no tendría influencia en los descendientes producidos.

24. (a) Habría $2^n = 8$ clases genotípicas y fenotípicas y se darían en la proporción 1:1:1:1:1:1:1:1.

(b) Habría dos clases y se darían en la proporción 1:1.

(c) Hay 20 unidades de mapa entre los loci *A* y *B* y el locus *C* se transmitiría independientemente de los loci *A* y *B*.

26. Asigne los siguientes símbolos, por ejemplo:

R = Rojo r = amarillo

O = Oval o = largo

Descendencia de A: *Ro/rO* × *rroo* = 10 unidades de mapa

Descendencia de B: *RO/ro* × *rroo* = 10 unidades de mapa

28. El porcentaje de segregación en la segunda división es 20/100 ó el 20%. Dividiendo por 2 (ya que solo dos de las cuatro cromátidas están implicados en un entrecruzamiento) da 10 unidades de mapa.

30. Para el Cruce 1:

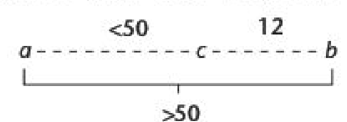
$$\frac{36 + 14}{100} = 50 \text{ unidades de mapa}$$

Ya que hay 50 unidades de mapa entre los genes *a* y *b*, no están ligados.

Para el Cruce 2:

$$\frac{3 + 9}{100} = 12 \text{ unidades de mapa}$$

Ya que los genes *a* y *b* no están ligados, podrían no estar en cromosomas homólogos o muy alejados (50 unidades de mapa o más) en el mismo cromosoma. Ya que los genes *c* y *b* están ligados y por consiguiente en el mismo cromosoma, es también posible que los genes *a* y *c* se encuentren en parejas de cromosomas distintas. En dicha situación, los NP y P (ditipos paternos) serían iguales; sin embargo, hay la posibilidad de que se dé la siguiente disposición y que los genes *a* y *c* estén ligados.



32. (a)

Tétradas del problema	*Clase*
1	NP
2	T
3	P
4	NP
5	T
6	P
7	T

(b) Si P > Np, entonces los genes están ligados. Si P = NP se transmiten independientemente. En el problema P = 44 y NP = 2. Por consiguiente los genes están ligados.

(c) Distancia de *c* al centrómero: = 7,2 unidades de mapa
Distancia de *d* al centrómero: = 15,9 unidades de mapa

(d) 20 unidades de mapa

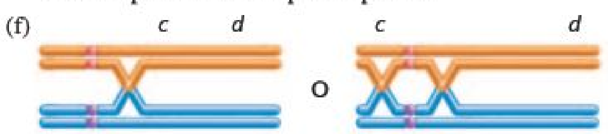
(e) C- - - - - - -c- - - - - - - -d

7.9 16.4

La discrepancia entre los dos sistemas de hacer el mapa se debe al modo en como se cuentan los productos de la segregación en la primera y segunda división. Por ejemplo, en la tétrada #1 hay realmente dos entrecruzamientos entre el gen *d* y el centrómero, pero se ha contabilizado como una segregación en la primera división. En la tétrada #4, se producen tres entrecruzamientos entre el gen *d* y el centrómero, pero se ha contabilizado como una. Si se dibujan todos los entrecruzamientos necesarios para producir las ordenaciones de las tétradas en este problema quedaría claro que hay muchos entrecruzamientos entre el gen *d* y el centrómero, que quedan sin detectar al contabilizar las ordenaciones del mismo gen *d*. Esto dará lugar a una menor estima de la distancia, lo que produce la discrepancia advertida.

Se podrían tener en cuenta estos entrecruzamientos adicionales para hacer el mapa más preciso.

(f)



34. *MDH1*: cromosoma 2
PEPS: cromosoma 4
PMG1: cromosoma 1

36. En los machos no hay entrecruzamiento, y si los dos genes están en el mismo cromosoma, habrá un ligamiento completo de los genes en los gametos masculinos. En las hembras, el entrecruzamiento dará lugar a gametos paternos y recombinantes. Lo que se tendrá serán los siguientes gametos de hembras (izquierda) y machos (derecha)

$bw^+\,st^+$	1/4	$bw^+\,st^+$	1/2
$bw^+\,st$	1/4	$bw\,st$	1/2
$bw\,st^+$	1/4		
$bw\,st$	1/4		

Combinando estos gametos se obtendrá la proporción presentada en la tabla de resultados.

38. El cruce sería como sigue:

$B^+B\,m^+m\,e^+e \times B^+?\,m?\,e?$

(El *?* se utiliza para indicar que no hay información que nos permita decidir si alguno de los alelos del macho está ligado al X.) Hay prácticamente tantos descendientes *ebony* (282) como los de color normal (283). Por consiguiente podemos concluir que el locus *ebony* no está ligado a *B* ni a *m*. Los descendientes más frecuentes en cuanto a la forma del ojo y el tamaño del ala son *miniature* y *Bar*. Esto sugiere que la disposición es «trans» o de «repulsión», como se indica a continuación:

$Bm^+/B^+m;e^+/e$

En este punto y sin conocimientos previos, todavía no sabemos si alguno de los genes está ligado al X; sin embargo, esto no tiene

importancia para la solución del problema. (En realidad, ambos loci *B* y *m* están ligados al X.)

La distancia de mapa entre *B* y *m* sería:

$(57+64)/(226+218+57+64)\times100=$

$121/565\times100=21{,}4$ unidades de mapa.

Concluiríamos que el locus *ebony* está o bien lejos de *B* y *m* (50 unidades de mapa o mas) o se encuentra en un cromosoma distinto. De hecho, *ebony* está en un cromosoma distinto.

Capítulo 6

2. (a) La necesidad de contacto físico entre las bacterias en la conjugación se estableció situando un filtro en un tubo en U de tal manera que el medio podía intercambiarse pero las bacterias no podían entrar en contacto.

(b) Tratando las células con estreptomicina, un antibiótico, se demostró que la recombinación no tenía lugar si una de las dos cepas bacterianas se inactivaban. Sin embargo, si la otra se trataba de manera similar, se producía recombinación.

(c) Una bacteria F^+ tiene una molécula de DNA, circular y de doble cadena, estructuralmente independiente, que puede dirigir la recombinación.

4. Cartografiar el cromosoma en un cruce Hfr $\times$ F^- tiene la ventaja de la transferencia orientada del cromosoma bacteriano a través del tubo de conjugación. Para cada tipo F, está fijado el punto de inserción y la dirección de la transferencia, por consiguiente rompiendo el tubo de conjugación en momentos distintos se obtienen diploides parciales con las partes correspondientes del cromosoma del donante que está siendo transferido. La longitud del cromosoma transferido depende de la duración de la conjugación, por lo que el mapa de los genes se basa en el tiempo.

6. El elemento F^+ puede integrarse en el cromosoma bacteriano del huésped y, al volver a su estado independiente, llevarse un trozo del cromosoma bacteriano. Cuando entra en una bacteria con un cromosoma completo, se forma un diploide parcial o merozigoto.

8. En el primer grupo de datos, la transformación de cada locus, a^+ o b^+, se da en una frecuencia de 0,031 y 0,012, respectivamente. Para determinar si hay ligamiento se tendría que determinar si la frecuencia de los dobles transformantes a^+b^+ es mayor que la esperada por la multiplicación de los dos sucesos independientes. Multiplicando $0{,}031 \times 0{,}012$ da 0,00037, o aproximadamente 0,04%. De esta información, se consideraría independencia entre estos dos loci. Advierta que esta frecuencia es aproximadamente la misma que la frecuencia del segundo experimento, en donde los loci se transforman independientemente.

10. En su experimento situó un filtro entre las dos cepas auxótrofas, que no permitía el contacto. La conjugación mediada por F necesita contacto y sin dicho contacto tal conjugación no puede darse. El tratamiento con DNasa demuestra que el agente filtrable no era DNA desnudo.

12. En la *transducción generalizada* prácticamente cualquier elemento genético de una cepa huésped se puede incluir en la cubierta del fago y por consiguiente ser transducido. En la *transducción especializada (restringida)* solo los elementos genéticos del huésped que están al lado del punto de inserción del fago se pueden transducir. La transducción especializada implica el proceso de lisogenia.

14. La recombinación en los virus se produce cuando hay un número suficientemente alto de virus que están infectando, por lo que hay una gran probabilidad de que a una bacteria la haya infectado más de un tipo de fago. En estas condiciones, los cromosomas de los fagos pueden recombinar.

16. Comenzando con un solo bacteriófago, un ciclo lítico da lugar a unos 200 fagos, tres ciclo líticos más producirían $(200)^4$ o 1.600.000.000 fagos.

18. En el Grupo A, *d* y *f* están en el mismo grupo de complementación (gen) mientras que *e* está en uno distinto. Por consiguiente

$$e \times f = +.$$

En el Grupo B, las tres mutaciones se encuentran en el mismo gen, por ello

$$h \times i = -.$$

En el Grupo C, *j* y *k* se encuentran en grupos de complementación distintos, como *j* y *l*. Sería imposible determinar si *l* y *k* están en el mismo o en diferente grupo de complementación si la región rII tuviera más de dos cistrones. Sin embargo, ya que solo hay dos regiones de complementación, y ambos no están en la misma con j, k y l deben estar en la otra.

20. 5×10^{-4}

22. T C H R O M B A K

24. (a) 4×10^{-5}

(b) La dilución sería 10^{-3} y el número de colonias sería 8×10^3.

(c) El mutante 7 podría muy bien ser una deleción, abarcando parte de los dos cistrones A y B.

26. (a) La rifampicina elimina a la cepa donante, que es rif^s.

(b) $\underline{b \quad a \qquad\qquad c \quad \text{F}}$

(c) Para determinar la localización del gen *rif* se podría utilizar una cepa donante que fuera rif^r pero sensible a otro antibiótico (por ejemplo, ampicilina). El experimento de la conjugación interrumpida se llevaría a cabo como normalmente en un medio con ampicilina, pero los recombinantes tendrían que resembrarse en un medio con rifampicina para determinar cuales eran sensibles.

28. Si dos genes se cotransforman a una frecuencia relativamente elevada, se dice que están «ligados» en el sentido de que estan más próximos que dos genes que no cotransforman. Los datos indican que *a* y *d* están ligados, *b* y *c* están ligados y ya que *f* cotransforma con *b*, entonces *b*, *c* y *f* están probablemente ligados. Sin embargo, si la disposición es $\underline{c \quad b \quad f}$ o la inversa, hay una posibilidad de que mientras que *c* y *f* estén «ligados» a *b*, *c* y *f* pueden no estar ligados lo bastante como para cotransformar. El gen *e* no cotransforma con ningún otro gen, por lo que debe ser independiente de los otros grupos de ligamiento.

30. (a) Algunas cepas, por ejemplo *E. fergusonii*, presentan una transferencia relativamente baja como cepas donantes, mientras que otras, como *E. chrysanthemi*, tienen una frecuencia de transferencia relativamente alta. La transferencia dentro de la especie no es necesariamente más frecuente que la transferencia entre especies. La dirección de transferencia (cuál es la cepa donante y cuál la receptora) influye en algunos casos en la frecuencia de la transferencia; por ejemplo, observe la frecuencia de transferencia cuando *E. chrysanthemi* es donante y *E. coli* receptora (−1,7), comparada cuando *E. coli* es donante y *E. chrysanthemi*, receptora (−3,7).

(b) *E. chrysanthemi* (−2,4); *E. coli-E. chrysanthemi*, (−1,7).

(c) Los plásmidos pueden compartir genes cuando las bacterias están próximas y ya que tales plásmidos puede tener genes patógenos o genes que transijan el uso de antibióticos, cualquier variante perjudicial que se desarrolle en una especie puede extenderse a otras. Mientras que un gen concreto puede ser perjudicial para una bacteria, puede conferir patogenicidad o resistencia a antibióticos a especies distintas.

Capítulo 7

4. La diferenciación sexual es la respuesta de células, tejidos y órganos a señales emitidas por los mecanismos genéticos de determinación del sexo. En otras palabras, los genes señalan las rutas de desarrollo por las que se generan los sexos. La diferenciación sexual es la serie compleja de respuestas a dichas señales genéticas.

6. En *Drosophila* es el equilibrio entre el número de cromosomas X y el número de dotaciones haploides de autosomas lo que determina el sexo. En la especie humana hay una pequeña región en el cromosoma Y que determina la masculinidad.

8. En la no disyunción *primaria*, la mitad de los gametos tienen dos cromosomas X mientras que los gametos complementarios no tienen cromosomas X. La fecundación de dichos gametos femeninos con dos X por un gameto con cromosoma Y, dará lugar al síndrome de Klinefelter XXY. La fecundación de un gametos femenino «sin X» por un gameto masculino normal con X dará lugar al síndrome de Turner.

10. No. Ya que el cromosoma Y no se puede detectar en estos cruces, no hay forma de distinguir los dos modos de determinación del sexo.

12. Debido a que los cromosomas X unidos tienen un modo herencia de madre a hija y el X del padre se transfiere al hijo, se verían hijas con el fenotipo de ojos blancos e hijos con el fenotipo alas miniatura.

14. Debido a que la sinapsis de los cromosomas en tejidos meióticos viene acompañada a menudo de entrecruzamiento, sería perjudicial para los mecanismos de determinación del sexo tener loci de determinación del sexo en el cromosoma Y que se transfiriesen por entrecruzamiento al cromosoma X.

16. Síndrome de Klinefelter (XXY) = 1
Síndrome de Turner (XO) = 0
47,XYY = 0
47,XXX = 2
48,XXXX = 3

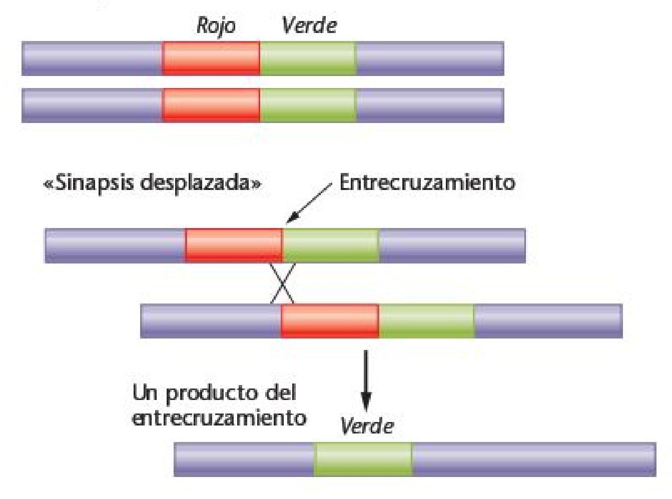
18. A menos de que se disponga de otros marcadores, citológicos o moleculares, no se puede comprobar la hipótesis de Lyon con genes homozigotos ligados al X. La prueba requiere identificar alelos alternativos para ver diferencias en la actividad de los cromosomas X.

20. La compensación de dosis y la formación de los corpúsculos de Bar ocurre sólo cuando hay dos o más cromosomas X. Los machos normalmente tienen un único cromosoma X, por lo que no puede producirse tal mosaicismo. Las hembras tienen normalmente dos cromosomas X. Hay casos de machos calicó que son XXY.

22. En los mamíferos, el esquema de la determinación del sexo depende de la presencia de un trozo del cromosoma Y. Si está, se produce un macho. En *Bonellia viridis*, la proboscis de la hembra produce alguna sustancia que dispara un patrón de desarrollo morfológico, fisiológico y de comportamiento que da lugar a machos. Para aclarar el mecanismo, se podría intentar aislar y caracterizar la sustancia activa comprobando diferentes fracciones químicas de la proboscis. Segundo, el análisis de mutantes normalmente proporciona enfoques críticos en los procesos de desarrollo. Dependiendo de las características del organismo, se podría intentar aislar mutantes que dieran lugar a cambios en el desarrollo de hembras o machos. Tercero, utilizando microtransplantes de tejidos, se podría intentar determinar que «centros» anatómicos del embrión responden a las señales químicas de la hembra.

24. Se podrían explicar las desviaciones significativas de la proporción 1:1 de machos a hembras sugiriendo que en la anafase I de la meiosis, el cromosoma Y se dirige más a menudo al polo que da lugar a las células espermáticas más viables. Se podría también especular que el esperma que lleva el Y tiene una mayor probabilidad de supervivencia en el tracto reproductor femenino o que la superficie del óvulo es más receptiva al esperma que lleva Y. En estos momentos el mecanismo no está claro.

26. Debido a la homología entre los genes *rojo* y *verde*, existe la posibilidad de una sinapsis irregular (véase la figura más abajo) que, después del entrecruzamiento, daría lugar a un cromosoma con sólo uno (*verde*) de los genes duplicados. Cuando este cromosoma X se combine con un cromosoma Y normal, se puede explicar el fenotipo del hijo.



28. (a) Algo se ha perdido en el sistema de determinación masculina de la determinación del sexo, a nivel de los genes, de los productos génicos, o de los receptores, etc.
(b) Es probable que el gen *S0X9,* o su producto, esté implicado en el desarrollo masculino. Quizá es activado por *SRY*.
(c) Probablemente hay alguna relación evolutiva entre el gen *S0X9* y el *SRY*. Hay considerables pruebas de que muchos otros genes y pseudogenes son también homólogos al *SRY*.
(d) El desarrollo sexual de la hembra normal no requiere al gen *S0X9* o a sus productos.

30. En las tortugas chiquiguao, la determinación del sexo está muy influenciada por la temperatura, de tal manera que los machos están favorecidos en el rango 26-34 °C. Por otro lado, las lagartijas parece que tienen determinado su sexo por factores distintos de la temperatura en el rango de 20-40 °C.

32. Las manchas blancas de CC se deben a un gen autosómico *S* que evita la formación de pigmento en el linaje de las células en donde se expresa. Los gatos homozigotos *SS* son más blancos que los heterozigotos *Ss* y no hay un patrón concreto de manchas debido al alelo *S*. Así la distribución de manchas blancas se esperaría que fuera diferente de Rainbow. Además, ya que la inactivación del cromosoma X es al azar, CC tendría un patrón de manchas distinto del de su madre genética, simplemente por la inactivación aleatoria del cromosoma X.

Capítulo 8

4. El hecho de que hay un efecto significativo de la edad de la madre asociado con el síndrome de Down indica que la no disyunción en mujeres mayores contribuye desproporcionadamente al número de individuos con el síndrome de Down. Además, ciertos datos de marcadores genéticos y citogenéticas indican la influencia en la no disyunción en la mujer.

6. Debido a que un alotetraploide tiene una posibilidad de producir bivalentes en la meiosis I, sería considerado el más fértil de los tres. Teniendo un número par de cromosomas para aparearse en la placa metafásica I, los autotetraploides se considerarían más fértiles que los autotriploides.

8. El algodón cultivado americano tiene 26 pares de cromosomas -13 grandes y 13 pequeños. El algodón del viejo mundo tiene 13 pares de cromosomas grandes. Es probable que ocurriera una hibridación interespecífica seguida de una duplicación de los cromosomas. Estos hechos produjeron probablemente un anfidiploide fértil (alotetraploide). Se han llevado a cabo experimentos para reconstruir el origen del algodón cultivado americano.

10. Aunque hay la apariencia de que los «heterozigotos» para una inversión suprimen el entrecruzamiento, el fenómeno se amplia por el hecho de que las cromátidas recombinantes acaban siendo normales en su contenido genético. Como tal no producen gametos viables (o competitivos) o dan lugar a la muerte del zigoto o del embrión.

12. El mutante *Notch* de *Drosophila* da lugar a moscas con alas anormales. Es un gen (una deleción) dominante ligado al sexo que también se comporta como letal recesivo. Un lazo de deficiencia (compensación) indica que están implicadas las bandas 3C2 hasta la 3C11. Los loci cercanos a *Notch* presenta pseudodominancia. Por otro lado, el gen *Bar* es el resultado de una duplicación de la región 16A del cromosoma X y da lugar a una forma anormal del ojo.

Hembras: N^+/N × machos: B/Y

1/4	N^+/B	hembras; Bar
1/4	N/B	hembras; Notch, Bar
1/4	N^+/Y	machos; silvestres
1/4	N/Y	**letal**

La proporción fenotípica final sería 1:1:1 para los fenotipos mostrados arriba.

14. Es probable que cuando ciertas combinaciones de genes tienen ventaja selectiva en un ambiente específico y estable, sería beneficioso para los organismos que la combinación de genes no se deshiciera mediante entrecruzamiento. Estando los genes en una inversión, las cromátidas recombinantes no se recuperan y por consiguiente no pasan a generaciones futuras. Las translocaciones ofrecen una oportunidad para nuevas combinaciones de genes por asociación de genes de cromosomas no homólogos. En ciertas circunstancias, tales combinaciones nuevas pueden tener ventajas selectivas y las condiciones de la meiosis han evolucionado de tal manera que la segregación de cromosomas translocados produce un grupo de gametos relativamente uniformes.

16. La primavera *Primula kevensis*, con sus 36 cromosomas, se ha formado probablemente por hibridación y posterior duplicación de los cromosomas en un cruce entre las otras dos especies, cada una con 18 cromosomas.

18. Los recombinantes dobles raros en el límite de una inversión paracéntrica o pericéntrica da lugar solo a diferencias pequeñas de la ordenación cromosómica estándar siempre y cuando la recombinación implique a las mismas dos cromátidas. Con recombinantes dobles entre dos cromátidas, la segunda recombinación anula a la primera. Sin embargo, en recombinates dobles entre tres o cuatro cromátidas tiene consecuencias que dan lugar a puentes anafásicos así como a un alto grado de gametos desequilibrados genéticamente.

20. En el trisómico, la segregación será «2 × 1» como se ilustra abajo:

P_1:

$b/b/b$ × b^+/b^+

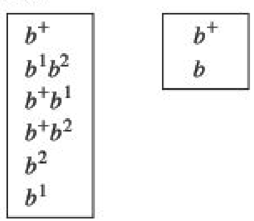
gametos: $(bb)(b)$ (b^+)

F_1:

$b^+/b^1/b^2$ × b^+/b
(quetas normales) (quetas normales)

Advierta que hay varios patrones de segregación originados por el trivalente en la anafase I.

gametos:



F_2:

b^+b^+ = quetas normales
$b^+b^1b^2$ = quetas normales
$b^+b^+b^1$ = quetas normales
$b^+b^+b^2$ = quetas normales
b^+b^2 = quetas normales
b^+b^1 = quetas normales
b^+b = quetas normales
bb^1b^2 = quetas *bent*
b^+bb^1 = quetas normales
b^+bb^2 = quetas normales
bb^2 = quetas *bent*
bb^1 = quetas *bent*

22. Dada alguna información del problema anterior, la expresión sería como sigue:

$(35/36W{:}1/36w)(35/36A{:}1/36a)$

$(35/36)^2$ W — — — A — — —

$35/(36)^2$ W — — — $aaaa$

$35/(36)^2$ $wwwwA$ — — —

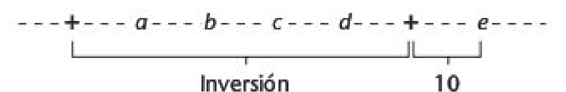
$1/(36)^2$ $wwwwaaaa$

24. Considerando que hay al menos tres unidades de mapa entre cada uno de los loci, y que solo se observan cuatro fenotipos, es probable que los genes *a b c d* estén incluidos en una inversión y que los recombinantes que se producen entre estos genes no se recuperan debido a su naturaleza genéticamente desequilibrada. En cierto sentido, la distancia mínima entre los loci *d* y *e* se puede estimar en 10 unidades de mapa

$$(48 + 52)/1{,}000;$$

Sin embargo, esta es realmente la distancia del locus *e* al punto de rotura que incluye la inversión.

El «mapa» por consiguiente sería:

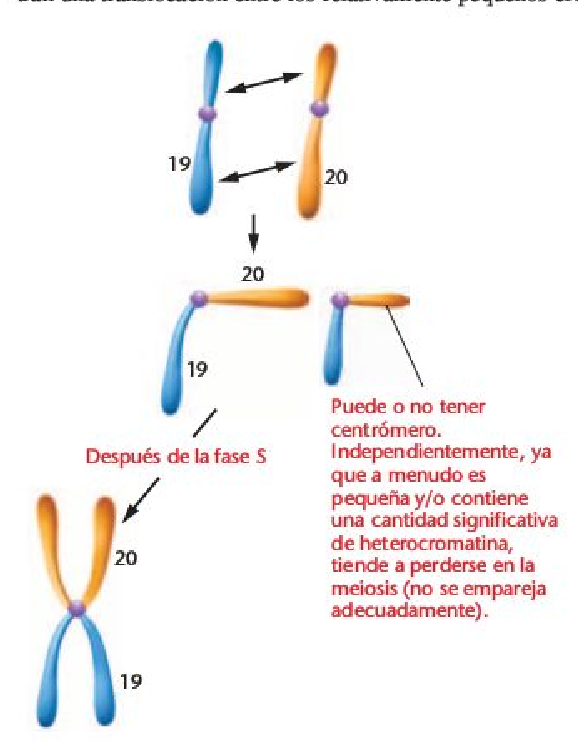


26. (a) El padre tiene que haber contribuido con el gen anormal ligado al X.

(b) Ya que el hijo es XXY y heterozigoto para la displasia anhidrótica, tiene que haber recibido tanto el gen defectuoso como el cromosoma Y de su padre. Así la no disyunción tiene que haberse producido en la meiosis I.

(c) Este fenotipo en mosaico del hijo está ocasionado por la inactivación del cromosoma X, una forma de compensación de dosis en los mamíferos.

28. Más abajo hay una descripción de la rotura y reunión que ilustran una translocación entre los relativamente pequeños cromosomas 19 (metacéntrico) y 20 (metacéntrico/submetacéntrico), de tamaño similar. El caso descrito aquí ocurre antes de la fase S de duplicación. El mismo fenómeno que se presenta en el texto ocurre después de la fase S. Ya que la probabilidad de tal translocación es bastante pequeña en una población normal, la consanguinidad juega un papel significativo para permitir que la translocación se «encuentre a si misma».



30. Esta hembra producirá en la meiosis los siguientes tipos:

normal: 18 + 21
tranlocado: 18/21
translocado más 21: 18/21 + 21
deficiente: sólo 18

La fecundación con un esperma normal 18 + 21 producirá los siguientes descendientes:
normal: 46 cromosomas
portador de la translocación: 45 cromosomas 18/21 + 18 + 21
trisomía del 21: 46 cromosomas 18/21 + 21 + 21
monosómico: 45 cromosomas 18 + 18 + 21, letal

Capítulo 9

2. La cepa mt^+ (resistente por lo genes nucleares y cloroplásticos) contribuye con el componente «citoplásmico» de resistencia a la estreptomicina, que impediría cualquier contribución de la cepa mt^-. Por consiguiente, todos los descendientes tendrán el fenotipo resistente a la estreptomicina. En los cruces recíprocos, siendo la cepa mt^+ sensible a la estreptomicina, todos los descendientes serán sensibles.

4. (a) neutral
(b) segregacional (mutaciones nucleares)
(c) supresiva

6. Los patrones de herencia de las dos, *segregacional* y *neutral*, son muy diferentes. El modo segregacional depende de genes nucleares, mientras que el tipo neutral depende de influencias citoplásmicas, es decir, de la mitocondria. Si se cruzan las dos como indica el problema, entonces se esperaría, en el zigoto diploide, que el alelo *segregacional* fuera «cubierto» por los alelos normales de la cepa neutral. Por otro lado, como los genes nucleares están de nuevo «expuestos» en el estado haploide de las ascosporas, se esperaría una proporción 1:1 de normales a petites. El fenotipo petite esta ocasionado por el gen nuclear *segregacional*.

8. (a) Es probable que las mitocondrias y los cloroplastos hayan evolucionado de bacterias en una relación simbiótica, por consiguiente no es sorprendente que ciertos antibióticos que influyen en las bacterias, también influyan en las mitocondrias y cloroplastos.

(b) Ya que la herencia de la resistencia o de la sensibilidad depende del estatus del gen mt^+, la cepa mt^+ es, claramente, la donante del *cp*DNA.

10. El hecho de que todos los descendientes (F_1) presente un patrón de arrollamiento dextrógiro de la concha indica que uno de los padres (el que actúa de madre) tiene el alelo *D*. Tomando estos descendientes y viendo que su descendencia (llamados estos F_2) se da en la proporción 1:1, indica que la mitad de los descendientes (F_1) son *dd*. Para tener estos resultados, uno de los padres tiene que haber sido *Dd*, mientras que el otro tiene que haber sido *dd*.

Padres: $Dd \times dd$

Descendientes (F_1): 1/2 *Dd*, 1/2 *dd*
(todos dextrógiros debido al genotipo de la madre)
Descendencia (F_2):
Todos aquellos de padres *Dd* serán dextrógiros mientras que todos los de padres *dd* serán sinistrógiros.

12. Ya que no hay evidencias de patrones de segregación típicos de genes cromosómicos y caracteres mendelianos, parece posible alguna forma de herencia extranuclear. Si el gen *apático* es dominante, entonces puede estar implicado un efecto materno. En tal caso, algunos de los descendientes F_2 serían hiperactivos debido a que el efecto materno es solo temporal, afectando sólo a la descendencia inmediata. Si la condición apática está ocasionada por algún agente infeccioso, entonces, quizás se podrían utilizar experimentos de inyección. Si está ocasionado por un defecto mitocondrial, entonces la condición persistirá en todos los descendientes de madres apáticas, a lo largo de más de una generación.

14. Ya que una mutación inicial no implica a todas las copias del mtDNA dentro de una mitocondria, el estado original es heteroplástico y el mtDNA mutado es raro. Si una nueva mutación no confiere ventaja selectiva a la célula huésped, es probable que la frecuencia de la mutación diminuya. Sin embargo, si la mutación confiere una ventaja selectiva a la célula, es probable que aumente su frecuencia. Dependiendo de una serie de factores, como el azar y el grado de ventaja selectiva, una mutación en el mtDNA puede llegar a ser abundante y establecerse finalmente homoplasmia.

16. (a) La presencia de machos bcd^-/bcd^- se puede explicar por el efecto materno: las madres eran bcd^+/bcd^-.

(b) El cruce

hembra bcd^-/bcd^- × machos bcd^-/bcd^-

dará lugar a una F_1 con embriogénesis normal debido al efecto materno. En la F_2, cualquier cruce que tenga madres bcd^+/bcd^- tendrá embriones fenotípicamente normales. Los descendientes de cualquier cruce con madres homozigotas bcd^-/bcd^- tendrán problemas en la embriogénesis.

18. (a) Un locus *Segregation Distortion* (*SD*) está presente en el cromosoma de tipo silvestre. Algunos aspectos del *SD* dan lugar al desplazamiento de la proporción de la segregación, favoreciendo al esperma que lleva el cromosoma *SD* a expensas del homólogo.

(b) Se podría utilizar este cromosoma *SD* en una serie de cruces y determinar que la segregación anormal se basa en un elemento cromosómico concreto. Se podría incluso cartografiar el gen *SD* en el segundo cromosoma (como se ha hecho).

(c) La distorsión de la segregación describe una situación en la que la segregación mendeliana típica está desplazad de 50:50.

20. Deficiencias que eliminan los genes de las histonas contribuyen a incrementar la supervivencia de la descendencia de madres *abo/abo*. Ya que la deficiencia de los genes de las histonas reduce la gravedad del efecto materno, es probable que esté implicada una superabundancia de histonas. La observación de que la adición de heterocromatina también reduce la gravedad del efecto materno, puede deberse al secuestro de la abundancia de histonas por la heterocromatina. Por consiguiente, se podría especular que el gen *abo* es un regulador de la producción de histonas. El alelo normal especifica un regulador negativo de los genes de las histonas mientras que el gen mutante *abo* no ejerce dicho control negativo.

Capítulo 10

2. Antes de 1940 la mayor parte del interés de los genéticos se centraba en la transmisión de las semejanzas y en la variación entre los progenitores y los descendientes (genética de la transmisión). Si bien algunos experimentos examinaban la posible naturaleza del material hereditario, los muchos conocimientos que se tenían sobre las propiedades estructurales y enzimáticas de las proteínas generaban un sesgo a favor de estas moléculas como sustancia hereditario. Además, las proteínas estaban compuestas por hasta 20 subunidades diferentes (los aminoácidos), lo que proporciona una gran variación estructural y funcional para las múltiples tareas que debe realizar el material genético. La hipótesis del tetranucleótido de Leven (estructura) proporcionaba una variabilidad insuficiente para justificar las diversas funciones del material genético.

4. Las enzimas de degradación específicas, las proteasas, la RNasa y la DNasa se usaron para eliminar selectivamente los componentes del extracto, y si la transformación se elimina al mismo tiempo, entonces la fracción eliminada es el principio transformante. La DNasa elimina el DNA y la transformación, por lo que debe ser el principio transformante.

6. Realmente, el fósforo se encuentra en cantidades aproximadamente iguales en el DNA y en el RNA; por lo tanto, el marcaje con ^{32}P «marcaría» tanto el DNA como el RNA. Sin embargo, el fago T2, en su estado maduro, contiene muy poco RNA, si es que contiene, por lo que se interpretaría que el DNA es el material genético en el fago T2.

8. Al comparar el contenido de DNA en diversos tipos celulares (esperma y células somáticas) y al observar que el espectro de *acción* y de *adsorción* de luz ultravioleta se correlacionaba, se consideró que el DNA era el material genético. Esta sugerencia se apoyaba en que de hecho de que se había demostrado que el DNA era el material genético en las bacterias y en algunos fagos. Las pruebas directas de que el DNA era el material genético provienen de diversas informaciones que incluyen la transferencia génica, que ha sido facilitada por las técnicas de DNA recombinante.

10. Las uniones entre los tres componentes requieren la eliminación de agua (H_2O).

12. Guanina: 2-amino-6-oxipurina
Citosina: 2-oxi-4-aminopirimidina

Timidina: 2,4-dioxi-5-metilpirimidina
Uracilo: 2,4-dioxipirimidina.

16. Puesto que en el DNA de doble cadena A=T y C≡G (dentro de los límites del error experimental), los datos presentados habrían indicado la falta de de estas bases y hubiese favorecido una estructura de cadena sencilla o de alguna otra estructura no unida por puentes de hidrógeno. Alternativamente, los datos parecerían indicar que A=C y T=G, lo que negaría la posibilidad de formación de los puentes de hidrógeno típicos ya que las relaciones de carga opuestas no existirían. Por lo tanto es poco probable que se formase algún tipo de estructura helicoidal cerrada. En conclusión, Watson y Crick podrían haber concluido que los puentes de hidrógeno no son un factor importante en el mantenimiento de una estructura de doble cadena.

18. Las tres diferencias principales entre el RNA y el DNA son las siguientes:
(1) El uracilo del RNA reemplaza la timina del DNA,
(2) la ribosa del RNA reemplaza la desoxirribosa del DNA, y
(3) a menudo el RNA está en forma de cadena sencilla y parcialmente de doble cadena, mientras que generalmente el DNA está en forma de doble cadena.

20. Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos (nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos de cadena sencilla y de doble cadena) absorben el máximo de luz UV a longitudes de onda comprendidas entre los 254 y 260 nm. Usando este fenómeno, a menudo se puede determinar la presencia y la concentración de ácidos nucleicos en una mezcla. Puesto que el máximo de absorción de luz UV de las proteínas se produce a 280 nm, esta es una manera relativamente sencilla de tratar las mezclas de moléculas con importancia biológica.

La absorción de UV es mayor en las moléculas de cadena sencilla (variación hipercrómica) comparado con las estructuras de doble cadena, por lo que aplicando condiciones de desnaturalización se puede determinar fácilmente si un ácido nucleico se encuentra en forma de cadena sencilla o doble. Además, el DNA rico en A—T se desnaturaliza más rápidamente que el DNA rico en G—C, por lo que se puede estimar el contenido de bases mediante la cinética de desnaturalización.

22. La guanina y la citosina se mantienen juntas mediante tres puentes de hidrógeno, mientras que la adenina y la timina se mantienen juntas mediante dos. Puesto que los pares de bases G—C son más compactos, son más densos que los pares A—T. Por lo tanto el porcentaje de pares G—C del DNA es proporcional a la densidad de flotación de la molécula.

24. De la curva *A* del problema, hay pruebas de especies de DNA que se renaturalizan rápidamente (repetitivas) y de especies que se renaturalizan lentamente (únicas). La fracción que se reasocia más rápidamente que el DNA de *E. coli* es altamente repetitiva, y la última fracción (con el valor $C_0t_{1/2}$ más alto) contiene básicamente secuencias únicas. La fracción B contiene mayoritariamente DNA único relativamente complejo.

26. Puesto que los pares de bases G—C se forman con tres puentes de hidrógeno y los pares de bases A—T se forman solo con dos, se precisa más energía (una temperatura más alta) para separar los pares G—C.

28. En una de las frases del artículo de Watson y Crick de la revista *Nature*, afirman:

«No se nos ha escapado que el emparejamiento de bases que hemos postulado sugiere inmediatamente un posible mecanismo de copia del material genético.»

El propio modelo indica que la desespiralización de la hélice y la separación de la estructura de doble cadena en dos cadenas sencillas exponen inmediatamente los puentes de hidrógeno específicos mediante los que nuevas bases son traídas al sitio correcto.

30. MS-2 = 200 pares de bases.
E. coli = 2×10^6 pares de bases.

32. Puesto que la citosina se empareja con la guanina y el uracilo con la adenina, tras una ronda de replicación el resultado sería una substitución de base de G:C a A:T.

34. (i) Los estudios de difracción de rayos X indicarían una estructura helicoidal, ya que es en estos datos en que se basa la sugerencia del patrón helicoidal. El hecho de que sea irregular puede indicar diámetros diferentes (emparejamientos de bases), cadenas adicionales en la hélice, dobleces o curvas.
(ii) La variación hipercrómica indicaría la presencia de considerables puentes de hidrógeno, posiblemente causados por emparejamientos de bases.
(iii) Estos datos pueden sugerir un emparejamiento de bases irregular en el que las purinas se unen a purinas (todas las bases presentadas son purinas), lo que daría las dimensiones atípicas.
(iv) Debido a la presencia de ribosa, la molécula puede mostrar más flexibilidad, dobleces y/o plegamientos.

Si bien hay diversas situaciones posibles para este modelo, todavía es probable que los fosfatos estén separados (en el exterior), debido a sus fuertes cargas. Probablemente los puentes de hidrógeno se encuentran en el interior de la molécula, y posiblemente hay una considerable flexibilidad, dobleces y/o plegamientos.

36. La aplicación de calor producirá variación hipercrómica si el DNA es de doble cadena. Se puede hacer una estima aproximada del contenido GC a partir de la cinética de desnaturalización, y del grado de complejidad de la secuencia a partir de análisis comparativos de renaturalización. Para estudios comparativos se podría usar la estimación del contenido de bases mediante hidrólisis y cromatografía, lo que también podría proporcionar pruebas del tipo de cadena del DNA. Podrían utilizarse anticuerpos contra DNA-Z para determinar el grado de estructuras levógiras, si es que hay. La secuenciación del DNA de ambos virus indicaría la homología de la secuencia. Además, mediante diferentes búsquedas electrónicas fácilmente disponibles en Internet (Página Web: *blast@ncbi.nlm.nih.gov*, por ejemplo) se puede determinar si hay secuencias similares en otros virus o en otros organismos.

Capítulo 11

2. Si se marcasen las bases nitrogenadas del DNA de *E. coli* con el isótopo pesado ^{15}N, sería posible «seguir» el DNA «viejo».

4. (a) En un modelo conservativo, todo el DNA recién marcado iría a una cromátida hermana, mientras que la otra cromátida hermana permanecería sin marcar.
(b) En un modelo dispersivo, todo el DNA recién marcado se intercalaría con el DNA no marcado.

6. La replicación *in vitro* requiere un molde de DNA, un catión bivalente (Mg^{++}) y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato: dATP, dCTP, dTTP y dGTP. La letra «d» minúscula hace referencia al azúcar desoxirribosa.

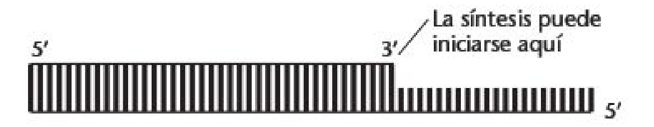
8. Dos aproximaciones analíticas generales mostraron que probablemente los productos de la DNA polimerasa I eran copias del DNA molde. Puesto que la *composición de bases* puede ser parecida sin que ello refleje una similitud de secuencia, la prueba menos restrictiva fue la comparación de la composición de bases. Al comparar la frecuencia de los vecinos más próximos, Kornberg determinó que era muy probable que el producto tuviese la misma secuencia de bases que el molde.

10. La tasa de síntesis *in vitro* de DNA usando la DNA polimerasa I es lenta, siendo más efectiva al replicar DNA de cadena sencilla que DNA de doble cadena. Además, DeLucia y Cairns descubrieron una cepa de *E. coli* (*polA1*) que replicaba su DNA a pesar de ser deficiente para la actividad de la DNA polimerasa I.

12. DNA *biológicamente activo* implica que el DNA es capaz de mantener las actividades metabólicas típicas de la célula o del organismo y que puede reproducirse fielmente.

14. La DNA polimerasa I y la DNA ligasa se usan para sintetizar y marcar un dúplice RF. La DNasa se usa para hacer un corte en una de las dos cadenas. El DNA pesado (que contiene ^{32}P/BU se aísla por desnaturalización y centrifugación, y la DNA polimerasa y la DNA ligasa se usan para hacer la cadena complementaria sintética. Una vez aislada, esta cadena sintética es capaz de transfectar protoplastos de *E. coli*, que producen nuevos fagos ϕX174.

16. Las tres enzimas comparten diversas propiedades comunes. Ninguno de ellos puede *iniciar* la síntesis de DNA de un molde, pero todas pueden *elongar* una cadena de DNA existente, suponiendo que haya una cadena molde como se muestra en la figura a continuación. La polimerización de los nucleótidos se produce en dirección de 5′ a 3′, en la que cada fosfato 5′ se añade al extremo 3′ del polinucleótido en crecimiento.



Las tres enzimas son grandes complejos proteicos con un peso molecular que excede los 100.000 daltons, y todas tiene actividad exonucleasa de 3′ a 5′.

DNA polimerasa I:
actividad exonucleasa
presente en grandes cantidades
relativamente estable
elimina el cebador de RNA

DNA polimerasa II:
posiblemente implicada en la función de reparación

DNA polimerasa III:
actividad exonucleasa
esencial para la replicación
molécula compleja

18. Dado un segmento de DNA de doble cadena, podría iniciarse la síntesis en un punto determinado, y las cadenas podrían replicarse sólo en una dirección (unidireccional) o en ambas direcciones (bidireccional), como se muestra a continuación. La síntesis de las cadenas complementarias se produce de manera *continua* 5′ > 3′ en la cadena líder en dirección a la horquilla de replicación, y de manera *discontinua* 5′ > 3′ en la cadena retrasada, en dirección opuesta a la de la horquilla de replicación.

20. Los *fragmentos de Okazaki* son fragmentos de DNA relativamente cortos (de 1.000 a 2.000 bases en procariotas) que se sintetizan de manera discontinua en la cadena retrasada durante la replicación del DNA. Estos fragmentos parecen ser necesarios porque no hay DNA molde disponible para síntesis 5′ > 3′ hasta que en la cadena adelantada se ha producido cierta síntesis continua de DNA, en la dirección de la horquilla de replicación. El aislamiento de estos fragmentos apoya este modelo de replicación. La *DNA ligasa* es necesaria para formar los enlaces fosfodiéster en los huecos que se generan cuando la DNA polimerasa elimina el cebador de RNA y encuentra delante DNA recién sintetizado. Las cadenas discontinuas de DNA se ligan entre sí en una sola cadena continua. La RNA primasa forma el *cebador de RNA*, que sirve de punto de iniciación para la producción de cadenas de DNA sobre un molde de DNA. Ninguna de las DNA polimerasas puede iniciar la síntesis sin un grupo 3′-hidroxil libre. El cebador de RNA proporciona ese grupo y por lo tanto lo puede usar la DNA polimerasa III.

22. Puesto que hay una cantidad mucho mayor de DNA a replicar, y que la replicación es más lenta, en los eucariotas hay múltiples sitios de iniciación (y más DNA polimerasa por célula) en comparación con el único origen de replicación de los procariotas. La replicación ocurre en distintos sitios durante intervalos diferentes de la fase S. En el texto se describen las funciones propuestas para las cuatro DNA polimerasas.

24. (a) En *E. coli*, se añaden 100 kb por minuto a cada cadena en crecimiento. Por lo tanto, la cadena debería tener unos 4.000.000 de pb.
(b) Dado que
$(4 \times 10^6 \text{ pb}) \times 0{,}34 \text{ nm/pb} = 1{,}36 \times 10^6 \text{ nm}$, o 1,3 mm.

26. La *conversión génica* es, probablemente, consecuencia de recombinación genética en la que una recombinación no recíproca genera productos en los que parece que un alelo se «convierte» en otro. Actualmente se considera que la conversión génica es el resultado de la formación de un heterodúplice acompañado de emparejamientos erróneos de bases. Cuando se corrigen estos emparejamientos se produce la «conversión».

28. La actividad de la telomerasa se encuentra en el tejido de la línea germinal para mantener la longitud de los telómeros de generación en generación. Dicho de otra manera, los telómeros no pueden acortarse indefinidamente sin terminar erosionando la información genética.

30.

Base marcada inicial	*Base marcada tras la digestión con fosfodiesterasa de bazo*	
	ANTIPARALELA	**PARALELA**
G	A,T	C,T
C	G,A,G	G,A
T	C,T, G	C,T,A,G
A	T,C,A,T	T,C,A,G

Se puede determinar que modelo ocurre en la naturaleza comparando como varía el patrón del fosfato marcado tras la digestión con fosfodiesterasa de bazo. Fíjese en el modelo antiparalelo y observe que (por ejemplo) la frecuencia en que «C» es el ve-

cino 5′ de «G» no es necesariamente la misma en que «G» es el vecino 5′ de «C». Sin embargo, en el modelo paralelo (b), la frecuencia en que «C» es el vecino 5′ de «G» es la misma en que «G» es el vecino 5′ de «C». Al examinar estas «frecuencias de digestión» se puede determinar que el DNA presenta una polaridad opuesta.

32. (a) La DNA polimerasa catalizaría la formación de un puente entre el extremo 5′ del último nucleótido añadido y el extremo 3′ del nucleótido entrante. En esta reacción, la energía sería suministrada por el corte de los fosfatos gamma y beta del último nucleótido añadido a la cadena, en vez de ser los fosfatos del nucleótido entrante.
(b) Si una DNA polimerasa eliminase una base, no podría añadir ninguna base más a la cadena porque la penúltima base tendría un monofosfato en vez de un trifosfato, y no tendría ninguna fuente de energía para la reacción de polimerización.

34. (a) 5′ACCUAAGU
(b) U

Capítulo 12

2. Al tener un cromosoma circular no hay extremos libres que presenten el problema de los cromosomas lineales, es decir, la replicación completa de las secuencias terminales.

4. Puesto que los cromosomas eucarióticos son «multireplicónicos» en el sentido de que en ellos hay múltiples horquillas de replicación, se esperaría ver múltiples grupos de radioactividad.

6. los elementos dispersos largos (LINES) son secuencias de DNA transponibles y repetitivas de los humanos. Los miembros de la familia más destacada, denominada **L1**, tiene 6,4 kb de longitud y se encuentran representados unas 100.000 veces. A menudo se dice que los LINES son retroposones porque su mecanismo de transposición se parece al de los retrovirus.

8. Debido a los diversos tipos celulares de los eucariotas pluricelulares, es necesaria la presencia de una mayor diversidad de productos génicos, lo que puede estar relacionado con el incremento de DNA por célula. Además, de la ventaja de la diploidía incrementa automáticamente el contenido de DNA en las células. Sin embargo, desde otra perspectiva, es probable que un procariota tenga un *porcentaje* mucho mayor de genoma implicado en la producción del fenotipo que un eucariota.

Los eucariotas han desarrollado la capacidad de obtener y mantener lo que parece ser una gran cantidad de DNA «extra», quizás «basura». En cambio, los procariotas, con relativamente corto ciclo biológico, son extremadamente eficientes en la acumulación y la utilización de su genoma.

Dada la gran cantidad de DNA por célula y la necesidad de que el DNA se reparta de manera ordenada entre las células hijas durante la división celular, han evolucionado determinados mecanismos y estructuras (mitosis, nucleosomas, centrómeros, etc.) para empaquetar y distribuir el DNA. Además, el genoma está dividido en entidades separadas (los cromosomas) para facilitar quizás el proceso de partición durante la mitosis y la meiosis.

10. Los nucleosomas son estructuras octoméricas de dos moléculas de cada tipo de histona (H2A, H2B, H3 y H4), excepto de H1. La histona H1 se encuentra entre nucleosomas, acomplejada con DNA de unión. Una secuencia de 146 pares de bases envuelve en nucleosoma.

12. La *hetrocromatina* es material cromosómico que se tiñe fuertemente y que permanece condensado cuando otras partes de los cromosomas, la eucromatina, se tiñe poco y está descondensada. Las regiones heterocromáticas se replican más tarde en la fase S y son relativamente inactivas en sentido genético porque contienen pocos genes, y los que contienen están reprimidos. Los telómeros y las áreas adyacentes a los centrómeros están formados por heterocromatina.

14. Volumen del DNA:

$$3{,}14 \times 10\ \text{Å} \times 10\ \text{Å} \times (50 \times 10\ \text{Å}) = 1{,}57 \times 10^{8}\ \text{Å}^{3}.$$

Volumen de la cápside:

$$4/3\ (3{,}14 \times 400\ \text{Å} \times 400\ \text{Å} \times 400\ \text{Å}) = 2{,}67 \times 10^{8}\ \text{Å}^{3}.$$

Puesto que el volumen de la cápside es mayor que el del DNA, el DNA encajará en la cápside.

16. Aproximadamente el 36,3%

18. Los cromosomas no están distribuidos aleotoriamente dentro del núcleo. Los cromosomas homólogos tienden a distribuirse en posiciones opuestas y de manera antiparalela, lo que significa que se encuentran en orden inverso en posiciones opuestas del núcleo. Suponiendo que estos patrones se mantengan durante todo el ciclo celular, es posible que la posición de los cromosomas influencie la función génica y/o el su comportamiento durante la mitosis y/o la meiosis. Si la función génica estuviese influenciada no solo por la posición del gen en el cromosoma sino también por su posición en el núcleo, entonces existiría una explicación alternativa para los efectos posicionales.

20. Los nucleosomas siguen un patrón *dispersivo* en el que cada cromátida hija contiene una mezcla de nucleosomas viejos y originales. Se puede probar la distribución de nucleosomas realizando un experimento de autorradiografía parecido al de Taylor-Woods-Hughes, pero en el que en lugar de marcar el DNA con timidina ^{3}H se marcaría una histona o todas ellas (H2A, H2B, H3 y H4) del nucleosoma.

22. El bacteriófago lambda está formado por una molécula de DNA lineal de doble cadena de unos 48.000 pares de bases. Puede formar una molécula circular cerrada de doble cadena gracias a una secuencia de 12 pares de bases de cadena sencilla situada en el extremo 5′ de cada cadena individual que sobresale y que es complementaria.

24. La frecuencia y el patrón general de varios motivos repetidos de trinucleótidos es similar en todos los grupos taxonómicos. Dentro de los genes, las repeticiones de trinucleótidos son el motivo repetido más frecuente en todos los grupos taxonómicos, seguidas de las repeticiones de hexanucleótidos. Una explicación podría ser que se generasen diversos tipos de microsatélites (mono, di, tri, etc.) a tasas diferentes en distintas regiones genómicas (dentro de los genes y entre ellos). Una segunda posibilidad es que la selección actúe diferencialmente en función del tipo y la localización de la repetición. La correlación entre la alta frecuencia de repeticiones de trinucleótidos y de hexanucleótidos dentro de los genes y el código de tripletes que especifica aminoácidos particulares en los genes no puede ser una coincidencia.

26. Si en general los microsatélites están flanqueados por secuencias conservadas, esas secuencias conservadas deben estar implicadas en la generación y/o en el mantenimiento del microsa-

télite. Alternativamente, el microsatélite puede generar la región no microsatélite. Cualquier hipótesis presentada necesita investigaciones adicionales antes de que se puedan hacer afirmaciones definitivas.

28. Generalmente, cuanto mayor es el contenido de AT en una cadena de DNA, menor es la temperatura de fusión o de desnaturalización. Puesto que se puede seguir el grado de separación de las cadenas mediante la absorción de luz ultravioleta (densidad óptica), se puede obtener una estimación del contenido AT/GC en un trecho dado de DNA. Para cadenas relativamente cortas de DNA, la temperatura de fusión está relacionada a la longitud de la cadena. Si los otros factores son iguales, cuanto más corta sea una cadena menor será la T_m.

30. Puesto que los dos genes citados en el problema se encuentran cerca del extremo del cromosoma 16, es posible que la erosión del extremo del cromosoma esté relacionado con la enfermedad. El examen del gen mediante hibridación *in situ* y clonación molecular indica que la talasemia implica una deleción terminal en la porción distal de 16p. para aprender más sobre estas condiciones, visite *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*, y siga el enlace OMIM.

Capítulo 13

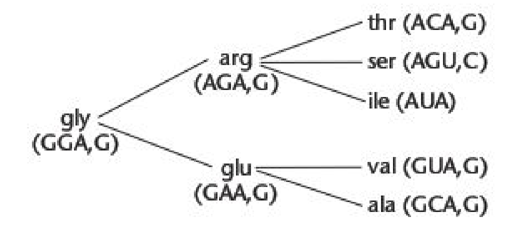
2. Dado un código de sextupletes, la restauración de la pauta de lectura solo ocurriría con la adición o la pérdida de 6 nucleótidos.

4. Debido a que el código es de tripletes, una vez iniciada una secuencia de trinucleótidos, ésta permanecerá en la misma pauta de lectura y producirá el mismo código a lo largo de toda la secuencia sin que importe el sitio de iniciación. Si se usa un tetranucleótido hay cuatro sitios de iniciación diferentes para leer el código, por lo que habrá cuatro secuencias diferentes.

6. A partir del polímero repetido ACACA... se puede decir que la treonina es CAC o bien ACA. El único codón común entre los polímeros CAACAA... y ACACA... es ACA. Por lo tanto, la treonina tendría el codón ACA.

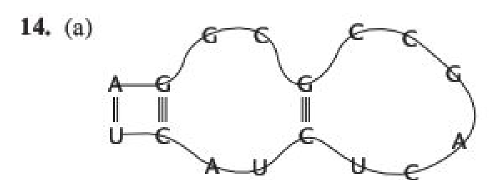
8. La base de la técnica es que si un trinucleótido contiene bases (un codón) que son complementarias al anticodón de un tRNA cargado, se forma un complejo relativamente grande que contiene el ribosoma, el tRNA cargado y el trinucleótido. Este complejo se atrapa en un filtro, mientras que los componentes por separado no quedan atrapados. Si el aminoácido de un tRNA atrapado cargado es radioactivo, entonces el filtro se vuelve radioactivo.

10. Aplíquese la ruta de cambios más conservativa.



12. Puesto que Poli U es complementario a Poli A, se formarán estructuras de doble cadena. Para que un RNA sirva de RNA mensajero debe ser de cadena sencilla, para que exponga las bases para la interacción con las subunidades ribosómicas y los tRNAs.

14. (a)



(b) TCCGCGGCTGAGATGA (use las bases complementarias, substituyendo T por U)

(c) GCU

(d) Suponiendo que AGG... es el extremo 5′ del mRNA, entonces la secuencia sería

arg-arg-arg-leu-tyr

16. (a) met-his-thr-tyr-glu-thr-leu-gly
met-arg-pro-leu-asp (o glu)

(b) En la secuencia más corta de las dos fases de lectura (la que empieza utilizando el triplete AUG interno), se introduce un triplete UGA en el segundo codón. Si bien no está en la fase de lectura del polipéptido más largo (que usa el primer codón AUG), el triplete AUG elimina el producto que empieza en el segundo codón de iniciación.

18. El dogma central de la genética molecular y, en cierto modo, de toda la biología, afirma que el DNA produce, por transcripción, el RNA, y que éste se descodifica (durante la traducción) para producir proteínas.

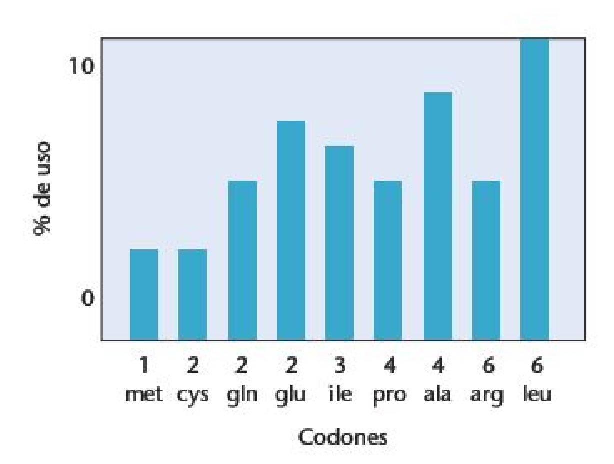
20. La RNA polimerasa de E. coli es una molécula compleja, grande (casi 500.000 daltons) formada por subunidades (α, β, β', σ) en la proporción $\alpha 2$, β, β', σ para la holoenzima. La subunidad b proporciona la función catalítica, mientras que la subunidad sigma (σ) está implicada en el reconocimiento de promotores específicos. El núcleo enzimático es la proteína sin la subunidad sigma.

22. Si bien se pueden producir algunos plegamientos en las moléculas de mRNA (debido a emparejamiento de bases complementarias), generalmente son estructuras de cadena sencilla fácilmente degradables. Generalmente los mRNAs eucarióticos se procesan de modo que se añade una «caperuza» al extremo 5′ y una larga serie de adeninas al extremo 3′. Se piensa que estas características protegen al mRNA de la degradación. Probablemente esta estabilidad del mRNA evolucionó con la diferenciación de las funciones nucleares y citoplasmáticas. Puesto que las células procariotas se encuentran en ambientes más inestables (por ejemplo, nutricional y fisiológicamente) que muchas de las células de los organismos pluricelulares, es probable que las respuestas genéticas rápidas a los cambios ambientales sean adaptativas. Para conseguir estas respuestas rápidas, es ventajoso que el producto génico sea fácilmente degradadle (mRNA). Una célula pancreática, que es estable desde el punto de vista del desarrollo y que se encuentra en un ambiente relativamente estable, podría producir más insulina si su mRNA fuese estable a una tasa transcripción dada.

24.

Prolina:	C_3 y uno de los tripletes C_2A
Histidina:	uno de los tripletes C_2A
Treonina:	un triplete C_2A y un triplete A_2C
Glutamina:	uno de los tripletes A_2C
Asparragina:	uno de los tripletes A_2C
Lisina:	A_3

26. (a,b) Use la tabla del código para determinar el número de tripletes que codifican cada aminoácido, y después construya una gráfica como la siguiente:



(c) Parece que hay una cierta correlación entre la frecuencia relativa de la utilización de aminoácidos y el número de tripletes para cada uno de ellos.

(d) Para continuar investigando este tema, se podrían examinar aminoácidos adicionales de manera parecida. Además, diferentes grupos filogenéticos usan los codones sinónimos de manera diferente. Sería posible encontrar situaciones en que las relaciones sean más extremas. También se podrían examinar más proteínas para determinar si esta ligera correlación es más fuerte con diferentes proteínas.

28. (a) gucccaaccaugcccaccgaucuuccgccugcuucugaagAUGCGGCCCAG

(b) 5′ gtc cca acc **atg** ccc acc gat ctt ccg cct gct tct gaa gAT GCG GGC CCA G

(c) 5′ gtcccaaccatgcccaccgatcttccgcctgcttctgaag **ATG** CGG GCC CAG

Los dos codones de iniciación no están en la misma pauta de lectura

(d) 5′ gtc cca acc **atg** ccc acc gat ctt ccg cct gct tct gaa gAT GCG GGC CCA G

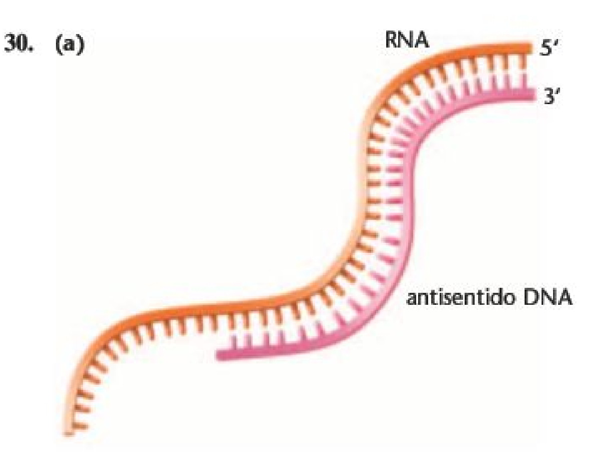
met pro thr asp leu pro ala ser glu asp ala gly pro

5′ gtcccaaccatgcccaccgatcttccgcctgcttctgaag **ATG** CGG GCC CAG

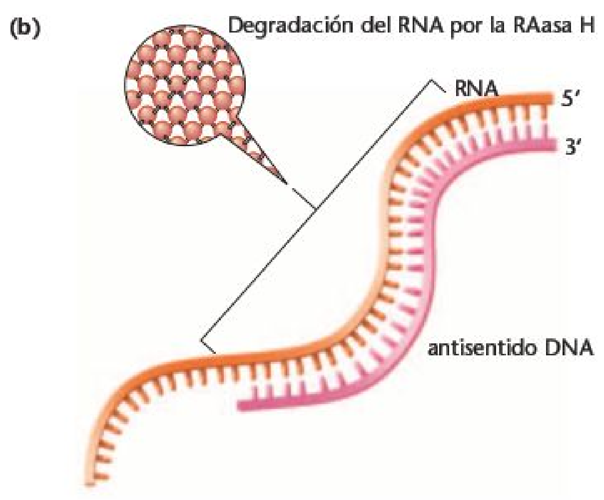
met arg ala gln

(e) Para la conservación del DNA se podría argumentar el hecho de tener la misma región codificante para múltiples productos, y este podría ser el caso en los virus y en los procariotas, donde la eficiencia genómica es más que un tema de debate. Sin embargo, parece menos probable que los eucariotas hayan desarrollado estrategias que conserven las secuencias de DNA *per se*. Sin embargo, si se pudiesen regular adecuadamente productos relacionados estructural y/o funcionalmente, entonces quizás existiría esta ventaja evolutiva. La desventaja más obvia es que si se produce una mutación en una región común, se alteran dos productos génicos en lugar de uno solo.

30. **(a)**



(b)



(c) Puesto que la cadena antisentido es relativamente corta, en condiciones fisiológicas la unión no específica de la cadena antisentido a otros RNAs de la célula puede causar la degradación de RNAs contra los que no va dirigida.

(d) Puesto que no se conoce el comportamiento exacto del DNA antisentido en la célula, la respuesta a esta pregunta es evasiva. Sin embargo, dada la complejidad de los sucesos intracelulares, es probable que la reducción de la expresión de un grupo génico represor pueda inducir otros genes al eliminar estos represores.

(e) Uno de los principales inconvenientes de la terapia antisentido es la falta de especificidad descrita y el comportamiento relativamente desconocido de los oligodesoxinucleótidos de DNA en las células vivas.

Capítulo 14

2. Los RNA transferentes son moléculas «adaptadoras» ya que proporcionan una manera para que los aminoácidos interaccionen con las secuencias de bases de los ácidos nucleicos. Los aminoácidos se unen al extremo 3′ de los tRNAs, que poseen una secuencia de 3 bases (al anticodón) para emparejarse con tres bases del mRNA, de manera específica e individualizada. El RNA mensajero, en cambio, contiene una copia del código de tripletes que almacenada en el DNA. La secuencia de bases del mRNA interacciona, de tres en tres, con los anticodones del tRNA.

Las enzimas implicadas en la transcripción incluyen las siguientes: la RNA polimerasa (en *E. coli*), o las RNA polimerasas I, II y III (en los eucariotas). Las que están implicadas en la traducción incluyen las siguientes: las aminoacil tRNA sintetasas, la peptidil transferasa y los factores de liberación dependientes de GTP.

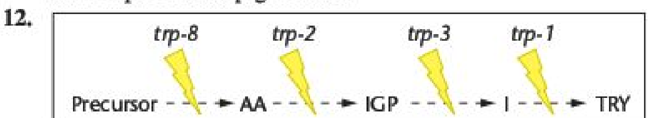
4. La secuencia de tripletes de bases del mRNA constituye la secuencia de codones. Una porción de tres bases del tRNA constituye el anticodón.

6. Los pasos implicados en la carga del tRNA se resumen en el texto. En presencia de ATP, de Mg^{++} y de una aminoacil sintetasa específica, un aminoácido produce un complejo enzimático aminoácido-AMP (+ PPi). Este complejo interacciona con un tRNA específico para producir el aminoacil tRNA.

8. La fenilalanina es un aminoácido que, como los otros aminoácidos, es necesario para la síntesis proteica. Si bien un exceso de fenilalanina y de sus derivados causa PKU en los fenilcetonúricos, si hay demasiado poca se restringirá la síntesis de proteínas.

10. La tirosina es un precursor de la melanina, el pigmento de la piel. Las personas con PKU no pueden convertir la fenilalanina en tirosina, y aunque la tirosina puede obtenerse de la dieta, a nivel poblacional, las personas con PKU tienen una tendencia a tener la piel menos pigmentada.

12.



14. El hecho de que las enzimas sean una subclase del término *proteína*, podría hacer parecer que la afirmación *un gen:una proteína* es más adecuado. Sin embargo, algunas proteínas están formadas por subunidades, estando cada una de ellas (las cadenas polipeptídicas) controlada por un gen diferente. En estas circunstancias, sería más razonable decir *un gen:una cadena polipeptídica*; sin embargo, hay muchas complejidades adicionales, por lo que es difícil justificar una afirmación simple concerniente a la relación de un trecho de DNA con su producto físico.

16. Los siguientes tipos de hemoglobina normal:

Hemoglobina	***Cadenas polipeptídicas***
HbA	$2\alpha 2\beta$ (alfa, beta)
HbA_2	$2\alpha 2\delta$ (alfa, delta)
HbF	$2\alpha 2\gamma$ (alfa, gamma)
Gower 1	$2\zeta 2\varepsilon$ (dseta, epsilon)

Las cadenas *alfa* y *beta* contienen 141 y 146 aminoácidos respectivamente. La cadena *dseta* es similar a la *alfa*, mientras que las otras cadenas son como la *beta*.

18. A finales de la década de 1940, Pauling demostró una diferencia en la movilidad electroforética entre la HbA y la HbS (la hemoglobina de la anemia falciforme), y concluyó que esta diferencia tenía una base química. Usando una técnica de huella molecular, Ingram determinó que el cambio químico ocurría en la estructura primaria de la porción globina de la molécula. Encontró un cambio en el sexto aminoácido de la cadena b.

20. El termino *colinearidad* hace referencia a la ordenación secuencial de subunidades, los aminoácidos y las bases nitrogenadas en las proteínas y el DNA, respectivamente. La secuenciación de los genes y de sus productos en el fago MS2, y estudios sobre las mutaciones en la subunidad A del gen de la triptófano sintetasa indicaron una relación colinear.

24. Las enzimas funcionan para regular las actividades catabólicas y anabólicas de las células. Influencian (disminuyen) la energía de activación, lo que permite que las reacciones químicas ocurran en condiciones que sean compatibles con los sistemas vivos. Las enzimas poseen sitios activos y/o otros dominios que son sensibles al ambiente. Se considera que el sitio activo es una grieta o un hoyo que unos los reactivos, incrementando así su interacción. Los otros dominios mencionados pueden influenciar la conformación y por lo tanto la función del sitio activo.

26. Todas las substituciones implican el cambio de una base.

28. Se puede concluir que el aminoácido no está implicado en el reconocimiento del codón.

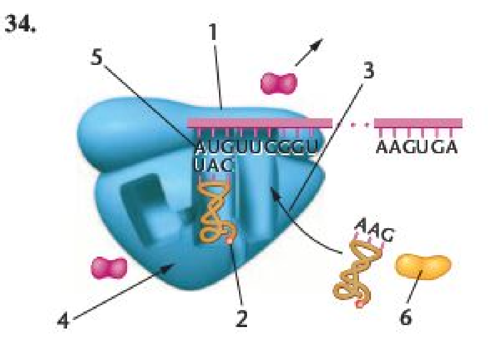
30. Puesto que el cruzamiento (**a, b**) es esencialmente un cruzamiento monohíbrido, no habría ninguna diferencia en el resultado si se produjese un entrecruzamiento entre los loci *a* y *b* (o si éste no se produjese).

32. (a) Los resultados del último cruzamiento, con la proporción 9:4:3, sugieren dos pares de genes.

(b) naranja = *Y_R_*
amarillo = *yyrr, yyR_*
rojo = *Y_rr*

(c) blanco- > amarillo-***y***- > rojo-***r***- > naranja (ruta V)

34.



36. (a) Puesto que la síntesis proteica depende del paso del mRNA desde el DNA hasta los ribosomas, cualquier circunstancia que comprometa este flujo provocará una reducción de la síntesis proteica. Cuanto más específico sea la unión del oligonucleótido antisentido al mRNA diana, más específica será la influencia de la síntesis proteica. La situación ideal se produciría cuando un tipo particular de oligonucleótido antisentido impactase en una y solo una población proteica.

(b) Claramente, una longitud de unos 15-16 nucleótidos es la más efectiva para causar la degradación del RNA.

(c) Probablemente hay diversos factores implicados *in vivo*, incluida la longitud del oligonucleótido. Es probable que la estabilidad del oligonucleótido sea dependiente de su composición de bases y de su longitud. El oligonucleótido debe ser suficientemente pequeño para difundir de manera efectiva a través de la célula para «localizar» el mRNA diana, y no debe asumir ninguna conformación plegada que bloquee las oportunidades de emparejamiento de bases. Puesto que estos oligonucleótidos son mucho más pequeños que el mRNA diana, también es probable que la localización real de la unión a la diana sea importante para la degradación del

mRNA. Uno de los principales problemas de la terapia antisentido es la introducción del oligonucleótido en el interior de las células diana.

Capítulo 15

2. Para seleccionar cepas que sean nutricionalmente deficientes (auxótrofas), los conidias mutagenizados se pueden cultivar en medio completo y después en medio mínimo. La transferencia individual de las cepas aisladas a medio mínimo al que se han añadido diversos suplementos permite aislar las mutaciones que pueden ser «reparadas».

4. Cada gen y su producto funcionan en un ambiente que también ha evolucionado, o coevolucionado. Para la vida es necesaria la producción coordinada de cada producto génico. Es probable que las desviaciones de la normalidad, causadas por mutación, sean perjudiciales debido al ambiente complejo e interactivo en el que cada producto génico debe funcionar. Sin embargo, en ocasiones se produce una variación beneficiosa.

6. Una mutación *condicional* es la que produce un fenotipo silvestre en una condición ambiental y un fenotipo mutante en una condición diferente.

8. Los tres agentes son mutagénicos porque causan substitución de bases. Los agentes desaminantes desaminan oxidativamente las bases de manera que la citosina se convierte en uracilo y la adenina se convierte en hipoxantina. El uracilo se empareja con la adenina, y la hipoxantina con la citosina. Los agentes alquilantes donan un grupo alquilo a los grupos amino o ceto de los nucleótidos, lo que altera las afinidades de emparejamiento. La 6-etil guanina se comporta como la adenina, por lo que se empareja con la timina. Los análogos de bases como el 5-bromouracilo y la 2-aminopurina se incorporan como timina y adenina respectivamente, aunque se emparejan con la guanina y la citosina respectivamente.

10. Los rayos X tienen más energía y una longitud de onda menor que la luz UV. Tienen más capacidad de penetración y pueden generar más alteraciones en el DNA.

12. La *fotoreactivación* puede conducir a la reparación del daño inducido por UV. Una enzima, la enzima fotoreactivadora, absorberá un fotón de luz para cortar los dímeros de timina. La *reparación por escisión* implica los productos de diversos genes, la DNA polimerasa I y la DNA ligasa para cortar el dímero inducido por luz UV, para rellenar el hueco y para sellar el esqueleto fosfodiéster del hueco resultante. El proceso de reparación por escisión puede ser activado por daños que distorsionen la hélice de DNA. La *reparación por recombinación* es un sistema que responde al DNA que ha escapado a los otros mecanismos de reparación en el momento de la replicación. Si se genera un hueco en una de las cadenas recién sintetizadas, una operación de rescate o «respuesta SOS» permite que se rellene el hueco. Hay muchos productos génicos diferentes implicados en este proceso de reparación: *recA*, *lexA*. En la reparación SOS se suprime la corrección de pruebas de la polimerasa III. Por eso se dice que es un sistema propenso a los errores.

14. Todos implican la amplificación de trinucleótidos repetidos. Al incrementar el grado de amplificación también aumenta el nivel de expresión del fenotipo anormal. Véase el texto para una descripción detallada de la función de los trinucleótidos repetidos en diversas enfermedades humanas. La anticipación genética es la aparición en edades cada vez más jóvenes de una enfermedad genética en las sucesivas generaciones.

16. La *xeroderma pigmentosum* es un tipo de cáncer de piel en humanos causada quizás por diversos genes autosómicos poco frecuentes que interfieren con la reparación del DNA dañado. Los estudios con heterocariontes proporcionan pruebas de complementación, que indican que puede haber hasta siete genes diferentes implicados. La enzima de reparación por fotoreactivación parece estar implicada.

18. Todos los organismos mencionados en el problema poseen diversos elementos transponibles. Las bacterias poseen secuencias de inserción (de unas 800 a 1.500 pares de bases de longitud) y transposones, que son más largos. Ambos elementos son móviles en el DNA bacteriano, vírico y plasmídico, y tiene secuencias de bases repetidas en sus extremos. En maíz, Barbara McClintock describió el comportamiento genético de los elementos móviles (Ds y Ac). Ds se puede mover si Ac se encuentra presente, por lo que existen *elementos controladores de la transposición*. Uno de los elementos Ac tiene 4.563 pares de bases de longitud, y su estructura es similar a la de algunos transposones bacterianos. A menudo los transposones codifican para enzimas transposasas, que son esenciales para la transposición. Los elementos *copia* de *Drosophila* pueden estar presentes en numerosas copias en el genoma, y contienen repeticiones terminales directas e invertidas. Los elementos *P*, también de *Drosophila*, son responsables de un fenómeno denominado disgénesis híbrida.

Los humanos poseen diversos elementos transponibles incluyendo la familia *Alu* de elementos dispersos cortos (SINES), cuya longitud es de 200 a 300 pares de bases y puede haber hasta 300.000 copias por genoma. Los elementos dispersos largos (LINES) también se encuentran en el genoma humano, y parecen capaces de moverse. Estos elementos comparten características estructurales comunes, a menudo son móviles y pueden influenciar la actividad génica.

20. Es probable que la transcriptasa reversa, al hacer DNA, proporcione un segmento de DNA que sea capaz de integrarse en el cromosoma de levadura, como se sabe que hacen otros tipos de DNA.

22. Es posible que con la reducción de determinados agentes ambientales que causan mutaciones, las tasas de mutación podrían reducirse. Por otro lado, determinadas actividades industriales y médicas realmente concentran los mutágenos (agentes radioactivos y productos químicos peligrosos). A menos que las poblaciones humanas estén protegidas de estos agentes, las tasas de mutación realmente podrían incrementarse. Si uno se pregunta sobre la acumulación de mutaciones, (no sobre las tasas) en las poblaciones humanas como consecuencia de la mejora de las condiciones de vida y de los cuidados sanitarios, entonces es probable que a medida que el medio ambiente se vuelva menos duro, la disminución de la presión selectiva tolerará más mutaciones. Sin embargo algunos estudios indican que, como las personas viven más tiempo y tienen los hijos más tarde, los varones mayores acumulan más mutaciones genéticas.

24. Las dos formas más importantes de distrofia muscular incluyen pérdida muscular de diferente gravedad y edad de aparición. Ambas formas estás causadas por mutaciones en el gen *distro-*

fina, que es muy largo, estando formado por 97 exones y 2,6 Mb de longitud.

26. Hay varias maneras por las que un gen mutante inesperado puede entrar en una genealogía. Si un gen tiene penetrancia incompleta, puede estar presente en una población y expresarse solo bajo determinadas condiciones. Es poco probable que el gen de la hemofilia se comporte de esta manera. Si la expresión de un gen se ve suprimida por otra mutación en un individuo, es posible que su descendencia herede este gen pero que no herede el supresor. Esta descendencia tendrá hemofilia. Puesto que toda la variación genética debe surgir en el mismo punto, es posible que la mutación en la familia de la reina Victoria fuese nueva, habiendo surgido en su padre. Finalmente, es posible que su madre fuese heterocigota y que, por casualidad no hubiese ninguna otra persona en su familia con tan poca suerte como para recibir el gen mutante.

28. Su estudio debe incluir el examen de los siguientes aspectos a corto término: valoración inmediata de la cantidad de radiación distribuida en una matriz del sitio de la bomba y de un área control que no recibiese la radiación inducida por la bomba; exposición a la radiación medida por enfermedades debidas a la radiación y pruebas de envenenamiento radioactivo a partir de muestras de tejido; la tasa de abortos; la tasa de nacimientos; y estudios cromosómicos. La valoración a largo término debería incluir: alteración de la proporción de sexos (los varones están más influenciados por los letales recesivos ligados a X que las hembras), estudios cromosómicos, la tasa de nacimientos y de abortos, la frecuencia y el tipo de cánceres y enfermedades genéticas. En cada caso, lo datos deben compararse con los del sitio control para ver si los cambios están relacionados con la bomba. Además, al intentar determinar la relación causa-efecto, a menudo es útil mostrar una respuesta a la dosis. Así, si se compara la localización de las personas en el momento de la exposición respecto a la matriz de cantidad de radiación, se puede determinar si las personas más expuestas a la radiación sufren las mayores alteraciones fisiológicas y genéticas. Si se observa una correlación positiva, entonces se pueden extraer conclusiones estadísticamente significativas.

30. (a) Para aquellos organismos que generan energía mediante respiración aeróbica, el proceso implica la reducción del oxígeno molecular. Se producen especies parcialmente reducidas como intermediarios y subproductos de esta acción molecular: O_2^-, H_2O_2 y OH^-. Estas especies son oxidantes electrofílicos potentes que escapan de la mitocondria y atacan numerosos componentes celulares. En conjunto, se denominan de oxígeno reactivo (ROS, del inglés *reactive oxygen species*).

(b)

oxoGuanina

Citosina — Guanina

Si se examinan superficialmente las estructuras del diagrama superior, no se hace obvio de forma inmediata que se deberían formar pares oxoG:A. Sin embargo, se pueden producir puentes de hidrógeno con cualquier otra base, incluyendo emparejamientos con una base igual. Los pares de homopurinas (A:A y G:G) y de heteropurinas (A:G) representan emparejamientos de bases anómalos incluso si son bases no alteradas. Si bien indudablemente G:C es la más estable, diversos emparejamientos erróneos son más estables que el emparejamiento A-T. El emparejamiento de bases se ve complicado por el hecho de que las purinas poseen dos superficies de unión a H, la de Watson-Crick, que implica las posiciones 1 y 6 del anillo de adenina, y las posiciones 1, 2 y 6 del anillo de la guanina, y la superficie de Hoogsteen que implica las posiciones 6 y 7 del anillo. El modo de emparejamiento típico se indica como *wc*, donde el emparejamiento ocurre en la superficie de Watson-Crick en la orientación normal, incluso en las A:G mal emparejadas. La alteración del emparejamiento y el favorecimiento de la superficie de Hoogsteen pueden ocurrir con la alteración generada por la oxoGuanina. Ciertamente, las configuraciones de triple hélice implican generalmente la superficie de Hoogsteen.

(c) Si no se repara (véase a continuación), la primera tanda de replicación implica el emparejamiento de oxoG a Adenina (véase el punto precedente), mientras que en la siguiente ronda de replicación la Adenina se empareja con la timina normal. Por lo tanto, si se empieza con en par G:C, una de las cadenas terminará con el par A:T.

(d) Resulta que las transversiones G:C > A:T se encuentran de forma común en cánceres humanos, y son especialmente predominantes en el gen supresor de tumores *p53*. Por eso se ha estudiado mucho el sistema defensivo celular. Uno de los componentes es una trifosfatasa que limpia el conjunto de nucleótidos precursores eliminando los dos fosfatos más externos de oxo-dGTP. Otro implica una DNA glicosilasa que inicia la reparación de oxoG:A mal replicado hidrolizando la unión glicosílica que une la base adenina al azúcar. Otro es un sistema de DNA glicosilasa/liasa que reconoce el oxoG opuesto a la citosina. De los tres sistemas, probablemente los más efectivos sean los de las DNA glicosilasas.

32. Es mucho más probable que las personas con *xeroderma pigmentosum* (XP) contraigan cáncer de piel durante la juventud que las personas no afectadas de XP. A los 20 años de edad, aproximadamente el 80% de la población XP tiene cáncer de piel, comparado con el aproximadamente 4% del grupo no afec-

tado. Las personas con XP carecen de uno o más genes implicados en la reparación de DNA.

Capítulo 16

2. En el control *negativo*, la molécula reguladora interfiere con la transcripción, mientras que en el control *positivo* la molécula reguladora estimula la transcripción.

4. (a) Debido a la deleción de una base al inicio del gen *lacZ* habrá un «corrimiento» en todas las pautas de lectura corriente debajo de la deleción. Es probable que ocurra una terminación prematura de la traducción de la cadena (debido a la introducción de un triplete sin sentido en la pauta de lectura), o que se ignore la terminación normal de la cadena. Sea como fuere, es probable que se produzca una condición mutante para el gen Z. Si se pone una célula como ésta en un medio con lactosa, será incapaz de crecer porque no dispondrá de β-galactosidasa.

(b) Si la deleción se produce al inicio del gen *A*, se podría esperar una alteración de la función del producto génico A, pero no influiría en el uso de lactosa como fuente de carbono.

6. $I^+O^+Z^+$ = Debido a la función del represor activo del gen I^+, y sin lactosa para influir en su función, **no se producirá la enzima**

$I^+O^cZ^+$ = **Se producirá enzima funcional**, porque el operador constitutivo está en *cis* respecto al gen Z. la lactosa del medio no tendría ninguna influencia porque el operador es constitutivo. El represor no se puede unir al operador mutante.

$I^-O^+Z^-$ = **Se producirá enzima no funcional**, porque con I^- el sistema es constitutivo pero el gen Z es mutante. La ausencia de lactosa en el medio no tendría ninguna influencia porque el represor no es funcional. El represor mutante no se puede unir al operador.

$I^-O^+Z^-$ = **Se producirá enzima no funcional**, porque con I^- el sistema es constitutivo pero el gen Z es mutante. La lactosa del medio no tendría ninguna influencia porque el represor no es funcional. El represor mutante no se puede unir al operador.

$I^-O^+Z^+/F'I^+$ = **No se producirá enzima**, porque en ausencia de lactosa el producto represor del gen I^+ se unirá al operador y inhibirá la transcripción.

$I^+O^cZ^+/F'O^+$ = Como hay un operador constitutivo en *cis* con el gen Z normal, **se producirá enzima funcional**. La lactosa del medio no tendrá ninguna influencia porque el operador es mutante.

$I^+O^+Z^-/F'I^+O^+Z^+$ = Como hay lactosa en el medio, la proteína represora no se unirá al operador y la transcripción se producirá. La presencia de un gen Z normal permitirá que **se produzca enzima funcional y enzima no funcional**. La proteína represora es difusible, y actúa en *trans*.

$I^-O^+Z^-/F'I^+O^+Z^+$ = Como no hay lactosa en el medio, la proteína represora (de I^+) reprimirá el operador y **no se producirá enzima**.

$I^sO^+Z^+/F'O^+$ = Con el producto de I^S hay unión del represor al operador, y por lo tanto **no se producirá enzima**. La ausencia de lactosa en el medio no tiene ninguna consecuencia porque el represor mutante es insensible a ella.

$I^+O^cZ^+/F'O^+Z^+$ = La localización del operador constitutivo (O^c) junto con el gen Z hará que **se produzca enzima funcional**.

8. Una sola célula de *E. coli* contiene muy pocas moléculas de represor de *lac*. Sin embargo, la mutación *lac* I^q provoca un incremento X10 en la producción de la proteína represora, lo que facilita su aislamiento. Usando diálisis contra un inductor gratuito radioactivo (IPTG), Gilbert y Muller-Hill pudieron identificar la proteína represora en determinados extractos de células *lac* I^q. Se purificó el material unido al IPTG marcado, y se demostró que era sensible a la temperatura y que tenía otras características de las proteínas. Los extractos de células *lac* I^- no se unen al IPTG marcado.

10. (a) Sin lactosa y sin glucosa, el operón está desconectado porque el represor de *lac* está unido al operador, y aunque CAP esté unido a su sitio de unión, éste no anulará la acción del represor.

(b) Con lactosa añadida al medio, el represor de *lac* se inactiva y el operón transcribe los genes estructurales. Sin glucosa, CAP está unido a su sitio de unión, incrementando la transcripción.

(c) Sin lactosa en el medio, el represor de *lac* está unido a la región operadora, y puesto que la glucosa inhibe la adenilciclasa, la proteína CAP no interaccionará con su sitio de unión. Por lo tanto el operón está «desconectado».

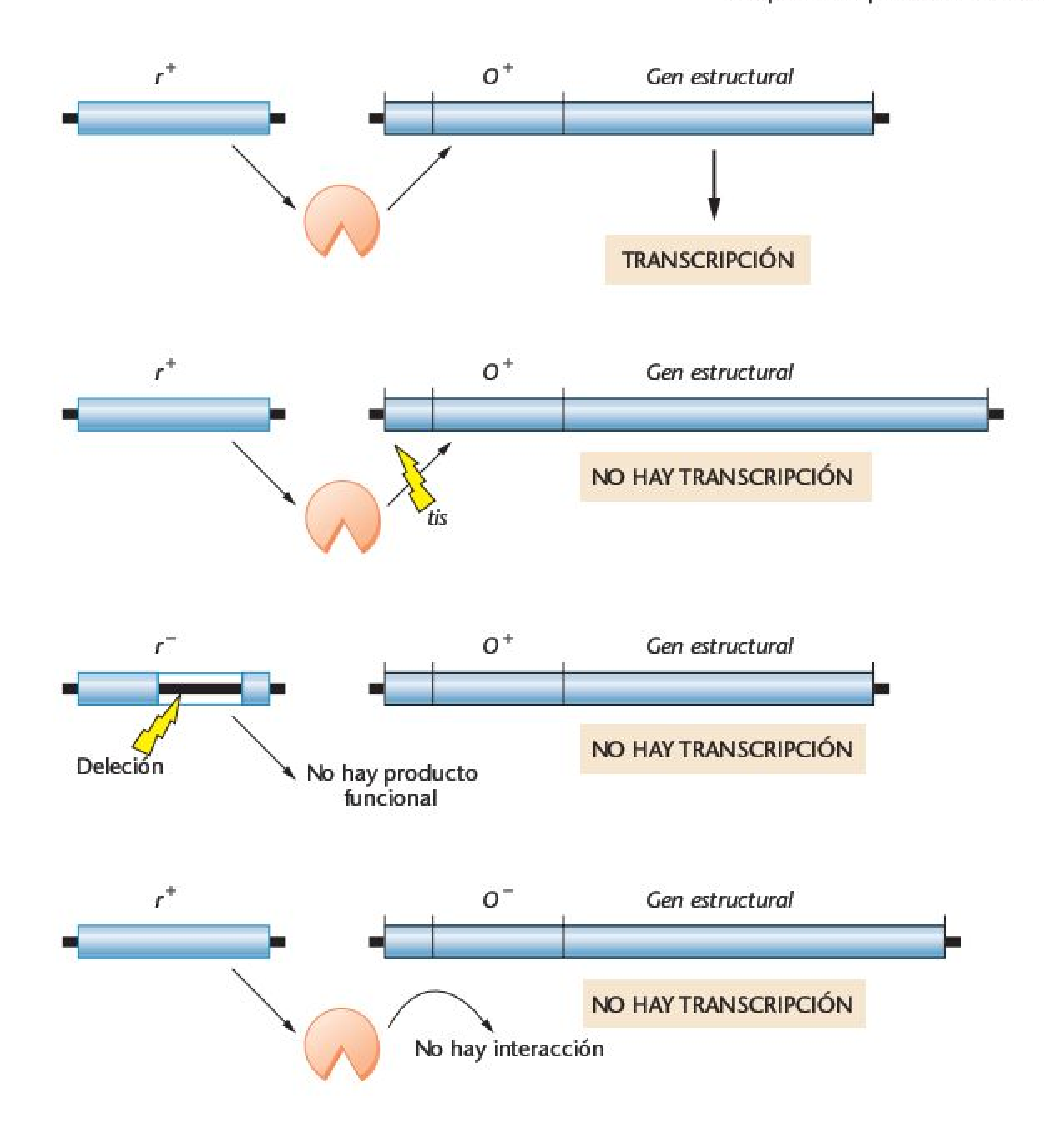
(d) Con lactosa en el medio, el represor de *lac* está inactivado. Sin embargo, como también hay glucosa, CAP no interaccionará con su sitio de unión. En estas condiciones la transcripción se ve gravemente disminuida, y se puede considerar que el operón está «desconectado».

12. La atenuación funciona para reducir la síntesis de triptófano cuando el suministro es suficiente. Lo hace reduciendo la transcripción del operón *triptófano*. El mismo fenómeno se observa cuando el triptófano activa el represor para desconectar la transcripción de este operón.

14. La neelaredoxina parece ser una proteína que defiende los organismos anaeróbicos y quizás también los aeróbicos del estrés oxidativo provocado por el metabolismo del oxígeno. La generación de radicales libres de oxígeno (que genera el estrés oxidativo) es dependiente de diversas especies moleculares incluyendo O_2 y H_2O_2. Aparentemente, en todo momento se producen niveles relativamente altos de neelaredoxina (*se expresa constitutivamente*), incluso cuando al sistema no se añaden los inductores potenciales de la expresión génica. El tratamiento con O_2 y H_2O_2 no hace que se exprese neelaredoxina adicional (*inducción*).

16. Puesto que una sustancia aplicada al medio (el antibiótico) provoca la síntesis de los componentes de la bomba de flujo, hay dos situaciones que parecen apropiadas. En un sistema de *control negativo* el antibiótico interrumpiría el represor para realizar la inducción (sería un sistema inducible). En un sistema de *control positivo* el antibiótico activaría un activador (también sería un sistema inducible).

18. Puesto que la deleción del gen regulador provoca la pérdida de la síntesis de las enzimas, puede pensarse que el producto del gen regulador ejerce un *control positivo*. Cuando *tis* está presente, no se hacen enzimas, por lo que *tis* debe inactivar la proteína reguladora positiva. Cuando *tis* no está presente, la proteína reguladora es libre para ejercer su influencia positiva sobre la transcripción. Las mutaciones en el operador neutralizan la acción positiva del regulador. El modelo que se muestra a continuación ilustra todos estos puntos.



20. (a) Una mutación constitutiva *lexA*$^-$ (mutación en el producto génico represor) y otra O^{uvrA-} (mutación en el operador).

(b) Se pueden hacer diploides parciales usando F′. O^{uvrA-} será dominante respecto O^{uvrA+}, y *lexA*$^-$ será recesiva respecto *lexA*$^+$. O^{uvrA-} actuará en *cis*.

22. Para empezar, encuentre la secuencia CACUUCC. Esta secuencia se empareja, con un solo emparejamiento incorrecto, con una segunda región. Pista: la tercera región está formada por siete bases y empieza por AG.

Capítulo 17

2. Su lista debería incluir:

remodelación de la cromatina
amplificación génica
transcripción
procesamiento y transporte
traducción

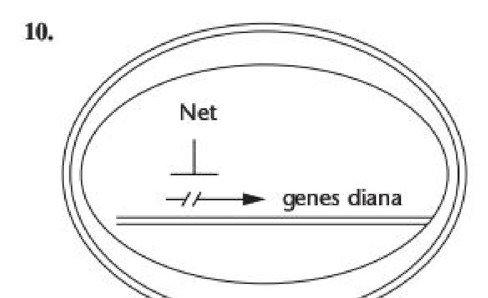
Vea el texto para una descripción completa de cada uno de estos temas.

4. Los factores de transcripción son proteínas *necesarias* para la iniciación de la transcripción. Sin embargo, no son *suficientes* para esta iniciación. Para activarse, la RNA polimerasa II precisa diversos factores de transcripción. Los factores de transcripción contiene al menos dos dominios funcionales: uno de unión a secuencia del DNA de los promotores y/o los intensificadores, y el otro interacciona con la RNA polimerasa o con otros factores de transcripción.

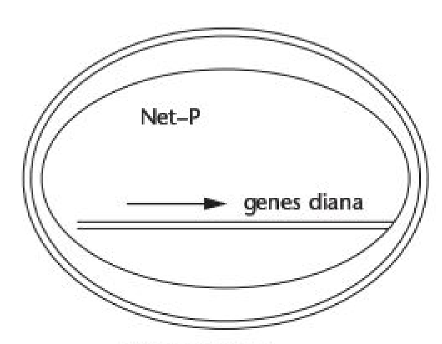
6. Tanto el sistema *lac* como el *gal* están influenciados por la represión por catabolito. Sin embargo, el sistema *lac* se encuentra bajo control negativo, mientras que el sistema *gal* está bajo control positivo. Ambos sistemas son inducibles.

8. Se apoya el modelo que describe la unión de los factores a la cadena polipeptídica naciente. Hay diversos experimentos que se podrían usar para probar dicho modelo. Uno podría estabilizar el complejo MREI-proteína propuesto con moléculas de unión, tratar con RNasa para digerir el mRNA y romper los polisomas, y luego aislar los ribosomas individuales. Se podría usar algún anticuerpo específico u otro método para determinar si las subunidades de tubulina han contaminado la población de ribosomas.

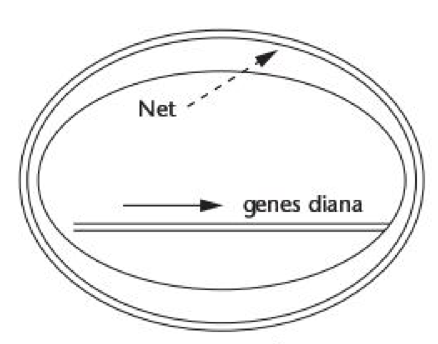
10.



Condiciones neutras



Net fosforilado



UV y choque térmico

Bocetos modificados de Ducret et al. *Molecular and Cellular Biology* 1999 19:7076-7087.

12. El fallo inherente es que el genoma en todas las células no linfoides es el mismo, por lo que ¿cómo variaría el plegamiento del DNA de manera que pudiese activar patrones de expresión génica específicos en células diferentes? Sin embargo, se puede decir lo mismo para cualquier forma de regulación génica en eucariotas. Las células altamente diferenciadas tienen el mismo material genético, por lo que ¿cómo se expresan genes diferentes en distintas células? Para apoyar la contribución del plegamiento diferencial de la cromatina a la regulación genética tal como se concibes actualmente (factores específicos celulares, proteínas) se puede aplicar el mismo principio que se aplica a la organización 3-D en el núcleo.

14. La metilación de CpGs causa una reducción de la expresión de luciferasa que es en cierto modo proporcional a la cantidad de metilación y al tamaño de la mancha. La metilación dentro de la unidad de transcripción reduce más drásticamente la expresión de luciferasa en comparación con la metilación fuera de la unidad transcripcional. Un alto grado de metilación fuera de la unidad transcripcional (593 CpGs) tiene un impacto remarcable sobre la depresión de la transcripción, como el mismo grado de metilación dentro de la unidad transcripcional.

16. El criterio para determinar la conservación del patrón de corte y empalme alternativo probablemente incluiría los siguientes factores:
(a) Una longitud similar del mRNA
(b) La conservación de los sitios de corte y empalme
(c) La posición de intrones homólogos
(d) El tamaño de los intrones homólogos
(e) La homología de la secuencia nucleotídica de los exones
(f) La semejanza físico-química de los aminoácidos predichos
(g) La misma orientación 5′-3′
(h) La conservación del uso de los codones de terminación (*stop*) alternativos en los sucesos de corte y empalme que implican cambio de pauta de lectura
(i) La conservación en el uso de las pautas de lectura alternativas en la traducción

18. Cuando se pierde la especificidad del corte y empalme, se pueden observar diversas clases de RNAs alterados: (1) diversas variantes no específicas que producen poblaciones de RNA con muchas longitudes y combinaciones de exones e intrones, (2) cortes y empalmes incompletos en los que los intrones y los exones se incluyen o excluyen erróneamente del mRNA, y (3) diversos productos sin sentido o productos proteicos truncados que resultan de la degradación prematura del RNA. Actualmente se desconoce si los procesamientos específicos en las células cancerosas inician la tumorigénesis o si son consecuencia de ella. Dada la complejidad de la inducción del cáncer y del mantenimiento del estado celular transformado, en verdad los productos génicos que son importantes para regular el ciclo celular pueden estar influenciados por el corte y empalme alternativo y, por lo tanto, pueden contribuir al cáncer.

Capítulo 18

2. El estadio G1 empieza después de la mitosis, y está implicado en la síntesis de muchos elementos citoplasmáticos. En la fase S se produce la síntesis de DNA G2 es un periodo de crecimiento y de preparación de la mitosis. La mayor parte de la variación temporal del ciclo celular está ocasionada por cambios en la duración de G1. G0 es un estadio en el que no hay división.

4. Las quinasas regulan otras proteínas añadiendo grupos fosfato. Las ciclinas se unen a la quinasas, activándolas o desactivándolas. CDK4 se une a la ciclina D, desplazando las células de la fase G1 a la S. En el límite G2/mitosis la CDK1 (una quinasa dependiente de ciclinas) se combina con otra ciclina (la ciclina B). Se produce fosforilación, provocando una serie de cambios en la membrana nuclear *vía* caldesmona, citoesqueleto e histona H1.

6. Decir que en carácter concreto se hereda conlleva la suposición de que cuando haya una circunstancia genética particular se revelará su fenotipo. Cuando se discuten las predisposiciones hereditarias, generalmente se hace referencia a las situaciones donde un fenotipo particular se expresa en familias siguiendo un patrón congruente. Sin embargo, puede que el fenotipo no se exprese siempre o que se manifieste de diversas maneras. En el retinoblastoma, el gen se hereda de manera autosómica dominante, y las personas que heredan el alelo *RB* mutante están

predispuestas a desarrollar un tumor ocular. Sin embargo, aproximadamente el 10% de las personas que se sabe que han heredado el gen en realidad no lo expresan, y en algunos casos su expresión implica solo un ojo en vez de los dos.

8. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso genéticamente controlado que conduce a la muerte de la célula. Es un proceso natural implicado en la morfogénesis, y es también un mecanismo de protección contra la formación de cáncer. Durante la apoptosis el DNA nuclear se fragmenta, las estructuras celulares se alteran y las células se disuelven. Las caspasas están implicadas en la iniciación y la progresión de la apoptosis,

10. Hay diversas maneras por las que los protooncogenes se convierten en oncogenes: mutaciones puntuales en las que el gen mutante actúa de «conmutador» positivo del ciclo celular, translocaciones donde se puede formar un gen híbrido, y sobreexpresions en las que un gen puede adquirir un nuevo promotor y/o intensificador. En el caso del RSV, el genoma de pollo capturó un oncogén (*c-src*).

12. Hay varias quinasas que pueden activarse por roturas en el DNA. Una quinasa denominada ATM y/o una quinasa denominada Chk2 fosforilan BRCA1 y p53. P53 activada detiene la replicación durante la fase S para facilitar la reparación del DNA. La proteína BRCA1 activada, junto con BRCA2, mRAD51 y otras proteínas nucleares, está implicada en la reparación del DNA.

14. Los protooncogenes son aquellos genes que normalmente funcionan para promover o mantener la división celular. En el estado mutado (oncogenes) inducen o mantienen una división celular incontrolada; es decir, es una ganancia de función. Generalmente esta ganancia de función adquiere el aspecto de una producción génica continua incrementada o anormal. Por otro lado, generalmente la pérdida de función se atribuye a los genes supresores de tumores, que funcionan para detener el paso a través del ciclo celular. Cuando estos genes están mutados, pierden la capacidad de detener el ciclo celular.

16. Desgraciadamente, es frecuente gastar grandes cantidades de dinero para tratar las enfermedades cuando ya se han producido en vez de concentrarse en su prevención. Demasiado a menudo la presión de grupos de interés especiales o la falta de estímulo político retrasa los avances en educación y prevención. Obviamente es menos caro, pero en términos de sufrimiento humano y de dinero, es mejor buscar medidas preventivas para cuantas enfermedades sea posible. Sin embargo, al haber adquirido conocimientos sobre la enfermedad, en este caso sobre el cáncer, también debe decirse que no importa que medidas preventivas se tomen, será imposible eliminar completamente esta enfermedad de la población humana. Sin embargo, es extremadamente importante que incrementemos los esfuerzos para educar y proteger la población humana de tantos agentes tóxicos ambientales como sea posible.

18. A menudo las células normales son capaces de soportar asaltos mutacionales porque tienen los puntos de control y los mecanismos de reparación del DNA en su sitio. El fallo de estos mecanismos puede resultar en un cáncer. A través de la mutación, estos mecanismos protectores se comprometen en las células cancerosas, y en consecuencia éstas muestran tasas de mutación, de anomalías cromosómicas y de inestabilidad genómica más altas de lo normal.

20. Determinados agentes ambientales como productos químicos y rayos X causan mutaciones. Puesto que los genes controlan el ciclo celular, las mutaciones en los genes que controlan el ciclo celular, o aquellas que impactan en el control del ciclo celular, pueden conducir al cáncer.

22. No, seguirá teniendo el riesgo general de la población de aproximadamente el 10%. Además, es posible que las pruebas genéticas no detecten todas las mutaciones de cáncer de mama.

24. Un tumor benigno es una masa pluricelular que normalmente se localiza en un sitio anatómico concreto. Los tumores malignos son aquellos generados por células que han migrado a uno o más sitios secundarios. Los tumores malignos son más difíciles de tratar y ponen en riesgo la vida de los afectados.

26. Como con muchas formas de cáncer, el único requisito no es la alteración de un solo gen. Los autores (Bose et al.) afirman «pero sólo infrecuentemente las células adquieren los cambios adicionales necesarios para producir leucemia en los humanos». Algunos estudios indican que variaciones (a menudo deleciones) en la región de los puntos de rotura pueden influenciar la expresión de CML.

28. Puesto que el control del ciclo celular se logra con productos génicos (proteínas codificadas en el DNA), cualquier agente que cause daños al DNA en un carcinógeno potencial. Puesto que se sabe que el humo el tabaco contiene un agente que cambia el DNA, en este caso provocando transversiones, es probable que se produzcan numerosos productos génicos modificados (incluyendo proteínas de control del ciclo celular). El hecho de que muchos pacientes de cáncer tengan estas transversiones en *p53* sugiere fuertemente que el cáncer es causado por agentes del humo de los cigarrillos.

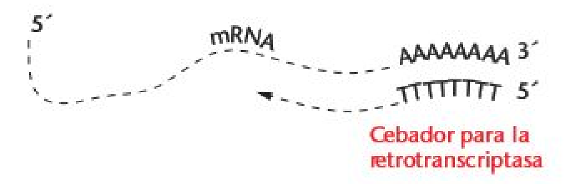
30. (a, b) Incluso aunque haya cambios en el gen *BRCA1*, estos no siempre tiene consecuencias fisiológicas. Estos polimorfismos neutrales dificultan el rastreo porque nunca se puede asegurar que una mutación cause problemas al paciente.

(c) Probablemente el polimorfismo en *PM2* es una mutación silenciosa porque la base implicada es la tercera del codón.

(d) Probablemente el polimorfismo en PM3 es una mutación sin sentido neutral porque la base implicada es la primera.

Capítulo 19

2. Típicamente los mRNAs eucarióticos tienen una cola de poliA en 3′, como se indica en el diagrama que se muestra a continuación. El segmento de poli-dT proporciona una sección de doble cadena que sirve de cebador para la producción de la cadena complementaria.



4. Se cree que la proteína interacciona con el surco mayor de la hélice de DNA. Esta información proviene de la estructura de proteínas que han sido suficientemente bien estudiadas para sugerir que el surco mayor del DNA y los «dedos» o extensiones de la proteína forman la base de la interacción.

6. Este segmento contiene la secuencia palindrómica GGATCC, que es reconocida por la enzima de restricción *BamHI*. La secuencia de doble cadena es:

CCTAGG
GGATCC

8. Los plásmidos fueron los primeros vectores usados en clonación, y todavía se usan de manera rutinaria para clonar fragmentos relativamente pequeños de DNA. Debido a su pequeño tamaño, es relativamente fácil separarlos del cromosoma de la bacteria huésped, y tienen relativamente pocos sitios de restricción. Pueden modificarse de forma relativamente sencilla (p.e. la adición de sitios de clonación múltiples y de genes reporteros). Para clonar trozos de DNA más largos como genes eucarióticos enteros, a menudo se usan los cósmidos. Por ejemplo, cuando se hacen modificaciones en virus bacteriano lambda (l), se pueden clonar insertos relativamente grande de aproximadamente 20 kb. Esta es una ventaja importante cuando es necesario clonar un gen grande o generar una biblioteca genómica de un eucariota. Además, algunos cósmidos solo aceptarán insertos de tamaño limitado, lo que significa que los fragmentos pequeños, quizás con menos sentido, no se clonarán innecesariamente. Tanto los plásmidos como los cósmidos padecen la limitación de que sólo pueden usar bacterias de huéspedes.

Los YACs (cromosomas artificiales de levadura) contienen telómeros, un origen de replicación y un centrómero, y se usan mucho para clonar DNA en levadura. Con marcadores de selección (TRP1 y URA3) y un grupo de sitios de restricción, en levadura se pueden clonar insertos de DNA de 100 a 1.000 kb. Puesto que levadura, que es un eucariota, realiza muchos de los pasos de procesamiento del RNA y de las proteínas típicos de otros eucariotas más complejos, presenta muchas ventajas cuando se trabaja con genes eucarióticos.

10. Este problema se puede resolver con las siguientes expresiones:

*Not*I	4^8
*Hin*fI	$4 \times 4 \times 1 \times 4 \times 4$
*Xho*II	$2 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 2$

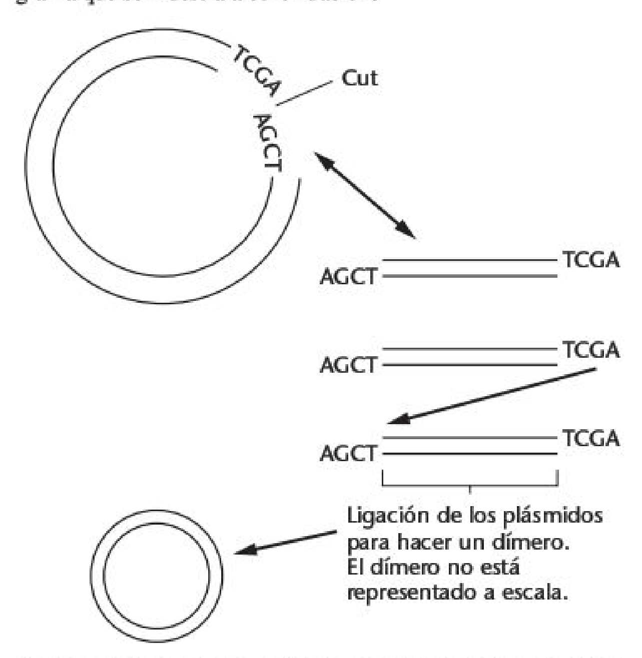
La razón de utilizar un «1» en la porción de *HinfI* es que en la «N» puede estar insertada cualquiera de las 4 bases, mientras que en la porción de *XhoII* sólo se pueden usar dos bases para «Pu» y para «Py».

12. (a) Puesto que el DNA de *Drosophila* se ha clonado en el sitio BamHI en el gen de resistencia a ampicilina del plásmido, el gen habrá mutado y cualquier bacteria con el plásmido recombinante será sensible a la ampicilina. Sin embargo, el gen de resistencia a la tetraciclina permanece activo. Las bacterias que se hayan transformado con el plásmido recombinante serán resistentes a la tetraciclina y por lo tanto se debería añadir tetraciclina al medio.

(b) Debería analizarse si las colonias que crecen en un medio con tetraciclina también crecen en un medio con ampicilina, mediante una réplica de la placa o con algún método parecido de transferencia controlada. Las bacterias que no crecen en el medio con ampicilina contienen probablemente el inserto de DNA de *Drosophila*.

(c) La resistencia a ambos antibióticos por una bacteria se podría explicar de diversas maneras. Primero, si el corte con *BamHI* fuese incompleto, no se esperaría ningún cambio en las propiedades biológica de los plásmidos no cortados. Además, también es posible que los extremos cortados del plásmido se ligasen juntos en la forma original sin inserto.

14. Dado que solo hay un sitio para la acción de *BamHI*, entonces lo que ocurrirá es lo siguiente. Se hará un corte que producirá extremos de cadena sencilla pegajosos de cuatro bases. Para que la resistencia a antibiótico esté presente, la ligación devolverá al plásmido a su forma original. Sin embargo, dos de los plásmidos pueden unirse para formar un dímero, como se indica en el diagrama que se muestra a continuación.



16. Debido al emparejamiento de bases complementarias, a menudo el extremo 3′ de la cadena de DNA forma un lazo consigo mismo, proporcionando un cebador para la DNA polimerasa I.

18. Para unir el DNA de las colonias que contienen los plásmidos recombinantes se usa un filtro. Se construye una sonda marcada para la secuencia de la proteína EF-1a. Puesto que es altamente conservada, debería mostrar una complementariedad considerable con el cDNA de EF-1a humano. Se usa para detectar el DNA de interés por hibridación. Se eligen las células con el clon deseado de la placa original, y se aísla el plásmido de estas células.

20. El problema se puede solucionar mejor si se dibujan las cadenas y entonces se ponen los sitios de restricción en la posición adecuada como se muestra a continuación:

enzima I ___350___|_____950_________

enzima II 200|__________1100________

Para determinar la orientación relativa de los sitios de restricción, examine los resultados de la doble digestión del DNA y observe que hay un fragmento de 150 pb, lo que significa que la enzima II corta dentro del fragmento de 350 pb generado por la enzima I. Por lo tanto el mapa final es el siguiente:

II I
200|__150__|______950_________

22. La opción (b) concuerda con lo que se espera porque la banda gruesa de la descendencia representa probablemente las bandas que se encuentran aproximadamente en la misma posición en ambos progenitores. Se espera que la probabilidad de esta concordancia sea baja en la población general.

24. (a) El tamaño global del fragmento es de 12 kb. A partir de la digestión con A + N, los sitios A y N deben estar a 1 kb de distancia. N debe estar a 2 kb del sitio E. El patrón n.º5 es la elección más probable. Observe que la digestión A + N rompe el fragmento de 6 kb generado por E.
(b) Si se dibujan líneas a través de las secciones que hibridan con la sonda, se puede ver que el único sitio de solapamiento consistente con la sonda es el fragmento de 1 kb entre A y N.

26. Tomando como 6 el número de bases reconocidas por *BamHI*, habría aproximadamente 4096 pares de bases entre los sitios de reconocimiento. Dado que el DNA de lambda contiene aproximadamente 48.500 pares de bases, habrá unos 11,8 sitios de restricción (48.500/4096).

28. T_m(°C) = 81,5 + 0,41 (%GC) – (675/N) = 81,5 + 0,41(33,3) – (675/21) = aproximadamente 63 °C. Si se rebaja en 5 °C nos da un buen punto de inicio de unos 58 °C para la PCR con este cebador. Obsérvese que el % de GC y la longitud del cebador incrementa la T_m(°C). Los pares GC contienen tres puentes de hidrógeno, en lugar de los dos puentes que hay entre los pares AT.

30. Puesto que no hay grupo 3'-hidroxil, la elongación de la cadena no puede realizarse, y los fragmentos resultantes que se forman se pueden separar por electroforesis. Donde se incorpora el ddNTP se establece la longitud de cada cadena y por lo tanto la posición de un ddNTP particular, lo que se usa para proporcionar la secuencia de bases del DNA.

Capítulo 20

2. Conocer la secuencia del DNA de un organismo es solo el comienzo. La anotación del DNA es un desafío importante. Incluso así, conocer cómo interaccionan los productos génicos en el tiempo y en el espacio (proteómica) requerirá más avances tecnológicos que todavía no se han considerado. El trabajo de Haas et al. Identificó variación en los sitios de corte y empalme exón/intrón, microexones y sitios alternativos de inicio de la transcripción. La correlación de diversos proyectos transcripcionales y traduccionales con el fenotipo será una aventura interesante.

4. (a) Suponiendo un tamaño promedio de los genes de 5.000 pares de bases, habría unos $6{,}7 \times 10^7$ pares de bases que comprenderían genes. Restando este valor de las 116,8 Mb da un total de 49,8 Mb de DNA entre genes. Si se divide 49,8 Mb entre los 13.379 genes se obtiene un resultado de unas 3.700 bases entre genes.
(b) 54.934/13.379 = 4,11 exones
(c) 48.257/13.379 = 3,61 intrones
(d) Hay un marcado incremento en el número de genes implicados en transcritos alternativos.

6. Primero calcule el número de pares de bases de las regiones heterocromáticas del genoma humano:

$$0{,}15 \times 3000 \text{ Mpb} = 450 \times 10^6 \text{ pb}$$

Puesto que en *Drosophila* hay un gen para cada 69.697 pb, debe haber:

$$450.000.000/69.697 = 6.456{,}5$$

genes en la región heterocromática de los humanos. Con toda probabilidad este número es una sobreestimación porque la densidad global en *Drosophila* es aproximadamente 10 veces superior que en los humanos. Si se aplica esta información al cálculo anterior, en la heterocromatina humana quizás haya unos 650 genes. Si este sencillo cálculo es correcto, entonces todavía hay un número considerable de genes no identificados. Además, puesto que estos genes se encuentran en la heterocromatina, pueden poseer propiedades especiales.

8. Las pautas de lectura abiertas se identifican mediante programas de ordenador basados en la identificación de codos de inicio (ATG) y de terminación (TAA, TGA, TAG). Obsérvese que el porcentaje de pares GC comparado con el de pares AT es bastante bajo en estos tripletes de puntuación. Por lo tanto, cuando se rastrean secuencias de DNA en busca de ORF con un alto contenido en AT, se obtienen muchas secuencias cortas que muy probablemente no están implicadas en la producción de proteínas. Sin embargo, cuando el DNA es rico en GC, aumenta la probabilidad de ORFs largos similares al tamaño de las secuencias codificantes de proteínas. Por lo tanto, la probabilidad de considerar erróneamente que una secuencia codifica una proteína aumenta en paralelo al contenido en GC, como se indica en la figura.

10. La genómica funcional busca entender las semejanzas funcionales de los genomas a través de las distancias filogenéticas y evolutivas. La genómica comparativa analiza la ordenación y la organización de las familias de genes dentro de los genomas y entre genomas.

12. Los operones son entidades genómicas en las que grupos de genes (a menudo) funcionalmente relacionados se encuentran bajo control coordinado. En *A. aerolicus* un operón contiene seis genes con funciones muy diversas. Este hallazgo y otros hallazgos parecidos hacen que se deba reconsiderar la definición clásica de operón.

14. Semejanzas y diferencias generales:

Levadura	***Bacteria***
DNA	DNA
doble cadena	doble cadena
cromosomas	circular (*E. coli*)
12,1 Mb	ácido nucleico desnudo
6.200 genes	4,6 Mb
	4.397 genes

M. janaschii (Arquea) tiene un genoma circular de doble cadena de unas 1,7 Mb con aproximadamente 1.738 genes codificantes. Contiene tres cromosomas y la mayoría de genes (58%) de este organismo no coinciden con ningún otro gen conocido.

16. Los genes bacterianos están densamente empaquetados en el cromosoma. Los genes que codifican proteínas se organizan en su mayoría en unidades transcripcionales policistrónicas sin intrones. Los genes eucarióticos están menos empaquetados en los cromosomas, y la mayoría de los que codifican proteínas están organizados como unidades transcripcionales únicas con intrones.

18. La duplicación génica es un fenómeno común revelado por el cuidadoso análisis de los datos de las secuencia genómicas. El relativamente pequeño y compacto genoma de *Arabidopsis* se parece al de *Drosophila* y al de *C. elegans*, pero no al de las plantas. La pérdida de DNA codificante y no codificante justifica compacto el genoma de *Arabidopsis*. Comparado con el de

maíz, el de arroz y el de cebada, en las áreas intergénicas tiene menos regiones de DNA repetitivo «vacías de genes», y se han perdido muchas copias de elementos transponibles (también intergénicas).

20. El genoma humano está formado por más de 3 mil millones de nucleótidos, de los que aproximadamente el 5% codifica genes. Al menos el 50% del genoma procede de elementos transponibles. Los genes están distribuidos de forma desigual en los cromosomas, con grupos ricos en genes separados por zonas pobres en genes (desiertos). Los genes humanos tienden a ser más largos y a contener más intrones que los de los invertebrados como *Drosophila*. Cientos de genes se han transferido de las bacterias a los vertebrados. Las regiones duplicadas son frecuentes,, lo que facilita las reordenaciones cromosómicas. El genoma humano parece contener aproximadamente entre 30.000 y 33.000 genes que codifican proteínas[1].

22. Suponiendo que la cepa APS sea la ancestral, las otras cepas parecen tener un genoma más pequeño, lo que indica una reducción genómica. El pequeño genoma de *Buchnera* tiene aproximadamente 448 kb, comparado con el tamaño del genoma de *M. genitalium*, de unas 600 kb y con aproximadamente 480 genes codificantes de proteínas. El genoma de APS codifica unos 564 genes en su genoma de 641 kb. En la cepa APS hay un gen cada 1136 pb (641.000/564), y en M. genitalium hay un gen cada 1250 pb (600.000/480). Con estos datos, la especie CEE debe codificar aproximadamente unos (448.000/1193) = 375,5 genes. (Nota: 1193 se ha obtenido como el promedio de la separación entre genes de las dos especies bacterianas mencionadas.) Usando estos cálculos, la cepa CEE contendría menos genes que *M. genitalium*.

Hay otras posibles aproximaciones para determinar el tamaño mínimo del genoma para mantener la vida. Entre ellas se incluirían los estudios informatizados en los que se puede estimar el número de reacciones químicas esenciales necesarias para la vida. Otra sería tomar un organismo con pocos genes y mutarlos de forma sistemática para ver si la eliminación de qué genes reduce la supervivencia. Mediante la eliminación de genes individuales o de grupos de genes por mutación se podría obtener el número mínimo de genes.

24. En general se esperaría que determinados factores (como la temperatura o la salinidad) favoreciesen la evolución incrementando la estabilidad proteica: la distribución de interacciones iónicas en la superficie, la densidad de los residuos hidrofóbicos y sus interacciones, el número de puentes disulfuro y de hidrógeno. Examinando la tabla de codones, una proporción alta de GC favorecería los aminoácidos Ala, Gly, Pro, Arg y Trp, y minimizaría el uso de Ile, Phe, Lys, Asn y Tyr. Todavía no se entiende cómo el sesgo de los codones influencia la estabilidad proteica.

La mayoría de secuencias genómicas mediante respuestas relativamente graduales a una selección suave durante largos períodos de tiempo. Sus patrones parecen los de un descendiente común. Si bien lo mismo puede decirse de los organismos adaptados a ambientes extremos, las extraordinarias demandas fisiológicas pueden dictar sesgos de secuencia inesperados.

26. Si bien la familia del gen de la β-globina es relativamente grande (60 kb), el análisis de la secuencia y el de restricción muestran que contiene seis genes, de los que uno es un pseudogén y que por lo tanto no produce ningún producto. Los cinco genes funcionales contienen todos ellos dos intrones de tamaño parecido, lo cuales, junto con las regiones flanqueantes no codificantes (5′ y 3′) y el DNA espaciador que hay entre los genes, justifican el 95% mencionado en esta pregunta.

Capítulo 21

2. (a) El *control del desarrollo del riñón* se puede estudiar más directamente en humanos y/o en ratones, ya que ambos son parecidos anatómica y fisiológicamente. Puesto que los ratones, y no los humanos, pueden manipularse genéticamente, el estudio de la genética del desarrollo del riñón en estos organismos probablemente sería más productivo. Si bien *Drosophila* tiene órganos excretores (túbulos de Malpighio), éstos no están estrechamente relacionados con el riñón de los mamíferos. La levadura no tiene órganos excretores; sin embargo, tanto la levadura como *Drosophila* tienen procesos de transporte de membrana, y muy probablemente la genética de estos procesos y aplicable a todos los organismos.

(b) El cáncer se puede estudiar en virtualmente todos los organismos modelo porque implica los fundamentos del control del ciclo celular. Sin embargo, gran parte de los que se conoce sobre el control del ciclo celular procede de trabajos en levadura, y dado que los sistemas de ciclo celular son procesos muy conservados, a menudo la información obtenida en cualquier organismo puede aplicarse de forma universal. La levadura está bien comprendida desde el punto de vista genético, y es más fácil de manipular (genética y ambientalmente) que los otros organismos enumerados. A menudo las líneas celulares de mamífero se usan para descubrir elementos reguladores homólogos a los vistos en levadura.

(c) La fibrosis quística está causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística que normalmente elimina iones cloro de la célula, lo que conduce a un ambiente celular externo más salado, lo que a su vez drena agua de la célula por ósmosis. Se ha clonado el gen *CFTR* humano, y se ha expresado en levadura, por lo que se dispone de una manera viable en un modelo de levadura para estudiar en gen, su regulación y su producto. Además, también se han desarrollado líneas celulares de *Drosophila* para estudiar los sistemas de expresión de los vertebrados en lo que respecta a las proteínas de los canales de iones. Usando estos sistemas transgénicos se puede incrementar el conocimiento de los sistemas de transporte en general. Aparentemente, el sistema más adecuado para estudiar la fibrosis quística humana desde un punto de vista genético sería ratón: sin embargo, si bien se han generados cepas con diversas mutaciones en el gen CFTR, los ratones no desarrollan los síntomas más graves de la fibrosis quística humana, es decir infecciones pulmonares crónicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Recientemente, se ha superado este problema con el desarrollo de una cepa de ratón que es hipersusceptible a esta bacteria (Coleman *et al.*, 2003), lo que es prometedor como organismo modelo para la CF. En

---

[1] *Nota del traductor:* el último recuento de genes en el genoma humano, realizado el 2005, ha disminuido este número hasta 20.000-24.000 genes.

función de la aproximación experimental, el modelo más adecuado pueden ser tanto líneas celulares humanas como *Drosophila* o levadura transgénicas o nuevos modelos de ratón.

(d) Los aspectos moleculares del metabolismo de la purina están muy conservados en todo el reino animal y en el de las plantas. Para estudiar la genética del metabolismo de la purina lo más fácil podría ser aprovecharse de la facilidad de los rastreos de mutantes en levadura. Además, determinadas cepas de *Drosophila* responden diferencialmente a los suplementos nutricionales de purina, por lo que se podría usar *Drosophila* para rastrear o seleccionar cepas con un metabolismo de las purinas alterado.

(e) Los análisis genéticos de la función inmunitaria en los vertebrados se podrían estudiar más directamente en modelos de ratón, en los que la manipulación genética es posible. Sin embargo, en *Drosophila melanogaster* se han encontrado y caracterizado un número relativamente grande de factores de transcripción con caja *forkhead* (FOX). Estos factores de transcripción son miembros de la amplia familia FOX, y desempeñan funciones cruciales en diversos aspectos de la regulación inmunitaria que van desde la supervivencia de los linfocitos hasta el desarrollo del timo. Por lo tanto sería posible estudiar en sistema inmunitario en diversos organismos, aprovechándose las particularidades de cada uno.

(f) Como el estudio del cáncer, la genética de la división celular se podría estudiar más directamente en levadura. La enorme comprensión genética, junto con la relativa facilidad de la manipulación genética, ya ha incrementando enormemente la comprensión de los procesos de división celular. Puesto que las mutaciones del ciclo celular obstaculizan la proliferación del organismo, a menudo se emplean con éxito mutaciones condicionales. Las células humanas y de ratón en cultivo también son útiles para estudiar aspectos específicos de la división celular; sin embargo, su manipulación genética es más difícil que en las células de levadura. En muchos casos, las estrategias de *knockout* y rescate son útiles.

4. El procedimiento básico en la mutagénesis específica de sitio mediante oligonucleótidos es sintetizar un oligonucleótido adecuado que sea homólogo a un gen o a una porción de un gen de interés. El oligonucleótido contiene una mutación deseada que puede implicar uno o más nucleótidos. El oligonucleótido se hibrida con el DNA de M13 que contiene el gen clonado de interés (o un fragmento del gen), y se une a la región homóloga. Se añade DNA polimerasa junto con otros componentes para polimerizar DNA *in vitro* para producir una molécula de M13 de doble cadena, que entonces se trasforma en *E. coli*, donde se replica. La replicación semiconservativa proporciona moléculas mutantes que se rastrean o seleccionan usando diversas técnicas estándar.

6. Los cromosomas balanceadores contienen múltiples inversiones solapadas que reducen enormemente la recuperación de cromátidas entrecruzadas. Usando estos cromosomas, el cromosoma o los cromosomas mutagenizados permanecen intactos. Estos cromosomas son más útiles cuando contienen genes marcadores dominantes como la forma del ojo o el ala, o el color de los ojos. Normalmente los cromosomas balanceadores contienen un gen letal recesivo, de modo que el cromosoma balanceador no existirá en estado homocigoto.

8. Los marcadores del color del pelaje son útiles para generar ratones *knockout* porque cuando se inyectan las células madre embrionarias en los blastocistos, las quimeras resultantes tendrán manchas de diferente color de pelo, lo que hace que sean fáciles de reconocer. En teoría, se podría usar cualquier otro marcador superficial (con pelo o calvo, etc.), siempre y cuando la expresión y la penetrancia del marcador dominante sea alta. Podría usarse cualquier prueba, molecular, bioquímica o visible, que permitiese determinar la presencia de un gen en un organismo; sin embargo, las pruebas que son claramente visibles son mucho más eficientes. Se podría imaginar un gen que proporcionase alguna sustancia necesaria para la supervivencia que circulase a través de los fluidos corporales. Si el blastocisto es deficiente para una sustancia vital, sólo las quimeras sobrevivirían.

10. (a) Si bien se pueden detectar las mutaciones autosómicas y dominantes con la técnica *ClB*, ésta está especialmente diseñada para detectar las mutaciones recesivas, especialmente pero no exclusivamente la letales, que estén ligadas al cromosoma X.

(b) El gen *l*, recesivo y ligado a X, se usa para excluir las moscas hemicigotas *CLB*/Y (machos) en la generación F_2. Si en la F_2 no aparecen machos, entonces es que en los machos mutagenizados se han introducido uno (o más) letales recesivos ligados a X.

(c) El cromosoma X con múltiples inversiones (*C*) evita la recuperación de productos de recombinación del cromosoma X, lo que deja el cromosoma X mutagenizado intacto.

(d) *C* es un cromosoma balanceador que contiene múltiples inversiones solapadas que reducen enormemente la recuperación de productos de entrecruzamientos (cromátidas).

12. Las mutaciones sensibles a la temperatura permiten recoger mutaciones que impactan en funciones vitales de las células. Para seleccionar dichas mutaciones se realiza un experimento de mutagénesis en el que, por ejemplo, las células de levadura se cultivan a 23 °C. En general, se selecciona un mutágeno que provoque cambios menores en el DNA, como análogos de bases, luz ultravioleta o nitrosoguanidina. Entonces se hace una placa réplica de las colonias resultantes a temperatura permisiva (por ejemplo 23 °C) y una muestra se incuba a temperatura restrictiva (por ejemplo 36 °C). Las colonias que no crecen a temperatura restrictiva es probable que contengan mutaciones letales sensibles a la temperatura. La placa original (a temperatura permisiva) permite seleccionar las células para nuevos análisis. Puesto que las células le levadura producen yemas cuyo tamaño caracteriza el estadio del ciclo celular, es posible aislar defectos del ciclo de división celular (*cdc*) por la morfología de las células. Además, si un gen controla un punto específico del ciclo celular, es probable que la morfología sea uniforme.

14. A menudo los patrones de expresión génica específicos tisulares y/o temporales se estudian mediante hibridación *in situ*, que puede revelar el patrón de un mRNA en un organismo. Como sonda se usa un cDNA marcado, que establece puentes de hidrógeno con el RNA. También se puede usar la técnica de transferencia *northern*, que implica la purificación el mRNA del tejido de interés. Finalmente, la inmunotinción se puede usar para generar un perfil de expresión proteica.

16. Los elementos P que contienen un marcador visible en la mosca huésped se modifican para que contengan un gen de interés. En-

tonces se inyecta el elemento P recombinante en huevos de *Drosophila*, junto con un plásmido ayudante que contiene el gen de la transposasa, que se transcribe y se traduce en el embrión, lo que permite que el elemento P se inserte en el DNA del embrión. Las moscas adultas recombinantes se pueden identificar por la expresión del marcador visible. Los descendientes de estas moscas pueden contener el gen de interés. Para generar un ratón transgénico, el DNA se inyecta en la célula huevo en el estadio de dos pronúcleos, y entonces se pone en el oviducto de una hembra pseudopreñada de ratón. Los descendientes resultantes se rastrean en busca de pruebas de la transgénesis. La diferencia entre estas dos técnicas reside en el tipo de DNA usado y en la célula a la que se inyecta.

18. Si la transgénesis se produce en un gen vital, puede que el organismo no sobreviva, y esto puede complicar seriamente el estudio. Además, a menudo los genes se ven influenciados por efectos posicionales, lo que hace que su función sea alterada por sus vecinos o por la localización cromosómica en sentido amplio (en la heterocromatina, por ejemplo). Si ocurren estos efectos posicionales, la interpretación precisa de la acción del gen se verá comprometida.

20. La selección de los mutantes ocurre cuando se generan las condiciones que eliminan los organismos irrelevantes, dejando sólo los mutantes de interés. A menudo el rastreo de los mutantes es más costoso, e implica el examen visual de los organismos.

22. La complementación genética permite a los investigadores determinar si dos o más mutaciones se encuentran en el mismo gen. Se determinan los grupos de complementación. La complementación funcional permite identificar la función de un gen clonado en una biblioteca de cDNA transformando cepas mutantes hasta que un clon de cDNA reestablece el fenotipo silvestre. A menudo esta aproximación se denomina experimento de rescate.

24. Primero, se deberían comparar los dos genes de interés respecto las secuencias de DNA disponibles en una base de datos como GenBank. Esto permitiría la identificación de genes o regiones de homología con los genes de la base de datos. Si se identifican genes homólogos en otros organismos, puede que su función sea conocida, o pueden proporcionar pistas sobre ella. Segundo, se deberían traducir las secuencias de DNA en las secuencias aminoacídicas. Puesto que se conoce la localización de los intrones y de los exones, esto debería ser directo. Una vez se ha obtenido la secuencia de aminoácidos, se puede comparar con las secuencias aminoacídicas de las bases de datos como SwissProt o BLAST. Con estas búsquedas se pueden descubrir homologías con otras proteínas de función conocida. Tercero, se deberían analizar los patrones específicos de expresión tisular y temporal usando diversas técnicas, como hibridación in situ, transferencia *northern*, inmunotinciones o la tecnología de las microordenaciones.

26. Es posible que levadura procese el gen candidato de forma parecida a la vista en humanos. Puesto que está implicada la acumulación de proteína anormal, levadura puede acumular la misma proteína si se transforma con el gen candidato. Sería interesante el esfuerzo de examinar esta posibilidad. Por ejemplo, la Dr. Susan Lindquist del Whitehead Institute ha descubierto una proteína de levadura que forma fibras amiloides parecidas a las que se encuentran en los pacientes de Alzheimer. Quizás la transformación de levaduras con el gen humano proporcionaría un producto génico que, idealmente, sería el mismo que se ve en humanos, o que al menos diese alguna idea sobre el comportamiento del gen.

28. El primer paso para obtener ideas sobre la funcionalidad de la secuencia de DNA es anotar la secuencia. El hecho de que posiblemente se produzca un motivo interesante sugiere, pero no prueba, que la secuencia no es DNA «basura». La anotación de la secuencia implica el uso de diversas herramientas de anotación que rastrean la secuencia en búsqueda de pautas de lectura abiertas (ORF) que empiecen con una secuencia de iniciación y terminen con una secuencia de terminación. Además, típicamente en los genes se encuentran otros puntos de referencia: la topología intrón/exón, las secuencias de unión intrón/exón, el sesgo de los codones, las secuencias de regulación corriente arriba, una señal 3' de poliadenilación y, en algunos casos, islas CpG. Una vez se ha identificado una secuencia y se ve que probablemente sea un gen, su comparación con otros genes conocidos bien estudiados puede proporcionar pistas sobre su función. A partir de esa secuencia de DNA se pueden predecir las secuencias aminoacídicas, que se pueden comparar con secuencias aminoacídicas en bases de datos como SwisProt o BLAST. Con estas búsquedas se pueden descubrir homologías con otras proteínas de función conocida. También se pueden analizar los patrones tisulares y temporales de expresión génica usando diversas técnicas, como hibridación *in situ*, transferencia *northern*, inmunotinción o la tecnología de las micoordenaciones.

30. El hecho de que las sondas de cDNA detecten un conjunto de RNAs en un sitio o en otro distinto a un ensayo de inmunofluorescencia, que localiza las proteínas, valida la complejidad de la regulación genética en los eucariotas pluricelulares. Es probable que el procesamiento o la eliminación del RNA específicos de tejido esté causando los resultados mencionados. Puesto que el ensayo de inmunofluorescencia detecta la proteína HOX en los análisis, los investigadores podrían querer concentrarse en localizar el mRNA responsable de su síntesis. Suponiendo que no vuelvan al estudio del cDNA, quizás algo bastante interesante es enmascarar su detección. Podría ser igualmente interesante burlarse del motivo por el que las sondas de cDNA detectan el mRNA pero no el producto proteico. A menudo estas excepciones a lo esperado son el punto de partida de descubrimientos monumentales.

Capítulo 22

2. Kleter y Peijnenburg usaron la herramienta BLAST de la página Web *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST* para realizar una serie de comparaciones de alineación de secuencias transgénicas con secuencias de proteínas alergénicas conocidas. De las 33 proteínas transgénicas rastreadas para la identidad de al menos seis aminoácidos contiguos encontrados en proteínas alergénicas, 22 dieron resultados positivos.

4. (a) Tanto las extracciones salinas como por columna de Lkt50 parecen ser capaces de inducir al menos el 50% de neutralización de la toxicidad cuando se inyectan en anticuerpos.

(b) Para desarrollar una vacuna comestible que funcione, se deben superar numerosas dificultades. Primero, el inmunógeno debe estar incorporado de forma estable en el material hereditario de la planta huésped, y la planta debe expresar

solo ese inmunógeno. Durante su ingesta, el inmunógeno debe pasar a través de la pared intestinal sin alterarse, o alterado de tal manera que estimule la respuesta inmunitaria deseada. Se debe garantizar que no se produzcan subproductos potencialmente tóxicos de la trasngénesis. Dicho de otra manera, se deben abordar amplios temas ecológicos y ambientales para evitar que una planta transgénica se convierta en un vector indeseado que dañe el medio ambiente o cualquier organismo que coma la planta (directa o indirectamente).

6. La terapia de incremento que usa productos génicos se beneficia de la aplicación de la moderna biotecnología sin tener que cargar con la alteración del genoma. La terapia génica de incremento, sin embargo, abre la puerta a diversos problemas éticos. ¿Qué límites pueden o deben imponerse a las personas o a las instituciones que buscan incrementar las cualidades humanas? ¿Qué cualidades deben abrirse al incremento? La terapia génica presenta riesgos médicos y éticos.

8. La terapia génica somática implica intentar alterar el material genético que no sea de las células de la línea germinal. La terapia de la línea germinal, si bien en cierto que es más eficiente (aunque quizás más difícil técnicamente), altera la línea germinal y lo transmite a la descendencia. Hay considerables problemas éticos asociados con la terapia del plasma germinal. Recuerda intentos anteriores de los movimientos eugenésicos de las pasadas décadas, que implicaron la utilización de emparejamientos selectivos para purificar la reserva humana. Algunos biólogos actuales han dicho públicamente que la terapia de la línea germinal *no* se realizará. La terapia génica de incremento suscita un dilema ético considerable. ¿Deberían usarse las técnicas genéticas para incrementar el potencial humano? En general, el sentimiento es que la terapia génica de incremento, como la terapia de la línea germinal, es inaceptable.

10. p53 y pBR son proteínas supresoras de tumores, y son necesarias para que la célula controle de manera efectiva su ciclo celular. La reducción de su actividad disminuiría los controles normales del ciclo celular, y muy probablemente conduciría al cáncer. Sería especialmente importante si la intención de estos vectores víricos fuese trata el cáncer, donde probablemente el ciclo celular ya se encuentra comprometido.

12. (a) Una microordenación es un soporte sólido que contiene una ordenación de muestras de DNA. Una ordenación típica contiene miles de muestras de DNA, que pueden ser pequeños oligonucleótidos, cDNAs o secuencias genómicas cortas. Las secuencias marcadas hibridan con los DNAs inmovilizados mediante emparejamientos de bases normales. Esta tecnología permite controlar los niveles de expresión de miles de genes virtualmente en cualquier célula de una población.

(b) Usando la tecnología de las microordenaciones, los investigadores pueden observar el comportamiento global del genoma en células cancerosas y normales y, comparándolas, determinar qué genes están activos o inactivos bajo determinadas circunstancias. Es posible identificar el conjunto de genes cuya expresión o falta de expresión define las propiedades de cada tipo de tumor. Por lo tanto esta aplicación conduce a un diagnóstico preciso y refina las terapias posibles. Además, los perfiles de las microordenaciones se pueden usar para determinar la eficacia de terapias particulares. Por ejemplo, se puede controlar las respuestas a la radiación y/o a la quimioterapia para determinar el grado de respuesta de las células.

14. *Drosophila* es un organismo experimental especial en lo que respecta al vasto conocimiento que se tiene de su genética, en que es fácil de cultivar y de manipular genéticamente, y en que contiene unos cromosomas especiales, los cromosomas politénicos, que proporcionan puntos de referencia visuales. Junto con el marcaje de sondas, (sitios marcados de secuencias), los puntos de referencia visibles (los cromómeros) y la fácil manipulación, se puede ver realmente dónde están localizados los genes en los cromosomas. *Drosophila* también contiene elementos P, que permiten insertar secuencias marcadoras en el genoma. La microdisección de los cromosomas también es útil para desarrollar clones específicos para la secuenciación. Además, se han desarrollado técnicas que permiten a los científicos determinar la distribución real de las actividades génicas en todos los tejidos del organismo (hibridación *in situ*).

16. La clonación por posición se basa en la segregación (mendeliana) y en el análisis de ligamiento. Es una ramificación de los métodos tradicionales de cartografía, y se usa para aislar, cartografiar y clonar un gen sin conocer su producto génico. Las enfermedades debidas a un solo gen con una expresión simple, preferentemente dominante, se estudian más fácilmente usando la clonación por posición.

18. La clonación por posición se basa en la segregación (mendeliana) y en el análisis de ligamiento. Dadas las numerosas limitaciones asociadas con estos análisis en las poblaciones humanas (familias y tamaño de la muestra), es poco probable que esta técnica se aplique con éxito a los caracteres complejos en un futuro próximo.

20. Puesto que ambas mutaciones ocurren en el gen CF, los niños que posean ambos alelos sufrirán CF. Siendo los dos padres heterocigotos, cada niño que nazca tendrá un 25% de posibilidades de desarrollar CF.

22. En general, las bacterias no procesan las proteínas eucarióticas de la misma manera que los eucariotas. Es más probable que los eucariotas transgénicos procesen correctamente las proteínas eucarióticas, lo que incrementa la probabilidad de que tengan una actividad biológica normal.

24. La respuesta que se proporciona se basa en la condición de que la persona I-2 sea portadora, y de que el hijo II-4 tenga la enfermedad. El fragmento de 3 kb se encuentra en el padre I-1 normal y en el hijo II-1 normal. El hijo afectado, el II-4, tiene el fragmento de 4 kb. Una hija, la II-2, es portadora, mientras que la otra hermana, la II-3, no es portadora.

26. Los dos problemas principales que se describen aquí son preguntas comunes concernientes a la ingeniería genética. La primera es la localización del DNA introducido en el tejido diana y en el genoma. Una domiciliación inadecuada puede tener graves consecuencias. Además, a menudo es difícil controlar la respuesta de un DNA introducido. La regulación genética es complicada y está sometida a diversos factores, incluyendo señales corriente arriba y corriente abajo y diversos tipos de procesamientos postranscripcionales. El control artificial de estos factores ha demostrado ser difícil.

28. La utilización del análisis por enzimas de restricción para detectar mutaciones puntuales en humanos es un proceso de ensayo y error tedioso. Dado el tamaño del genoma humano en

términos de secuencias de bases y el relativamente bajo número de enzimas de restricción únicos, la probabilidad de que concuerden con una mutación puntual específica, separada de otras variaciones de la secuencia normales, en un gen deseado, es baja.

30. (a) Se excluye que esté ligado a Y, se excluye que sea recesivo y esté ligado a X, es posible pero poco probable que sea autosómico recesivo porque se dice que el gen es poco frecuente, es posible que sea dominante ligado a X si es heterocigoto, es posible que sea autosómico dominante.

(b) Probablemente el cromosoma 21 con el marcador *B1* contenga la mutación.

(c) El gen de la enfermedad segrega con cierta certeza con el marcador de RFLP B1 en la familia. Puesto que la madre también tiene el marcador B3, se pueden analizar los descendientes. Si el hijo lleva el marcador B3, entonces el o ella no lleva el marcador B1 que ha estado segregando con el gen defectuoso. Sin embargo, esta predicción no es completamente exacta porque un entrecruzamiento en la madre podría poner el gen indeseado con el marcador B3.

(d) Las posibilidades incluyen: un entrecruzamiento entre los sitios de restricción en el padre dando un cromosoma B1, o una mutación que eliminase el sitio de restricción B2 o B3.

Capítulo 23

2. El hecho de que los núcleos de casi cualquier origen permanezcan activos en transcripción y traducción acredita el hecho de que el código genético y los procesos subordinados de transcripción y traducción son compatibles a lo largo de los reinos animal y vegetal. Ya que el óvulo representa un sistema «cerrado» y aislado que puede manipularse mecánicamente, ambientalmente y hasta cierto punto bioquímicamente, se pueden desarrollar varias situaciones que permitan estudiar aspectos de la regulación génica. Por ejemplo, la influencia de los activadores y supresores transcripcionales se puede estudiar junto con factores que afecten a la traducción y a los procesos post-traduccionales. Combinaciones de núcleos inyectados pueden revelar interacciones núcleo a núcleo, que normalmente no se podrían estudiar con otros métodos.

4. Los discos imaginales son pequeños grupos de células que se forman durante los estadios larvarios. Hay 12 pares de discos bilaterales de ojo-antena, patas, alas, etc. y un disco genital.

6. (a-d) Los genes que controlan el desarrollo temprano a menudo dependen de la acumulación de sus productos (mRNA, factores de transcripción, diversas proteínas estructurales, etc.) en el óvulo por la madre. Tales genes de efecto materno controlan los primeros pasos, como la definición de la polaridad antero-posterior. Tales productos se sitúan en los óvulos en la oogénesis y se activan inmediatamente después de la fecundación. Los fenotipos de mutaciones de efecto materno varían desde la determinación del plan corporal general a la pigmentación del ojo y la dirección del enrollamiento de la concha.

8. (a, b) Los genes zigóticos se activan o reprimen dependiendo de su respuesta a productos de genes de efecto materno. Tres subgrupos de genes zigóticos dividen al embrión en segmentos. Estos genes de segmentación normalmente se transcriben en el embrión en desarrollo y sus mutaciones son letales en el embrión. Los genotipos maternos tienen genes zigóticos y estos pasan al embrión como cualquier otro gen.

10. Debido a que el citoplasma polar tiene información para formar células germinales, se podría esperar que tal transplante generase células germinales en la región anterior. El trabajo realizado por Illmensee y Mahowald en 1974 verificaron este supuesto.

12. Hay una serie de planteamientos para determinar el nivel de control de un gen dado. Primero, se puede determinar si los niveles de hnRNA son consistentes en varios tipos de células de interés. Esto se realiza a menudo bien por aislamiento directo del RNA y estimación por transferencia northern o por utilización de la hibridación *in situ*. Si el conjunto del los hnRNA para un gen dado son consistentes en varios tipos celulares, entonces el control transcripsional se puede eliminar como posibilidad. Apoyo para el control de la traducción se puede lograr directamente determinando, en diferentes tipos celulares, la presencia de una serie de mRNA con secuencias comunes. Esto se puede realizar solo en los casos en que se tenga suficiente conocimiento para capturar y marcar mRNA específicos. A veces se pueden obtener pistas sobre el control de la traducción vía corte y empalme alternativo examinando la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Las semejanzas en ciertos motivos estructurales/funcionales pueden indicar el procesado alternativo del RNA.

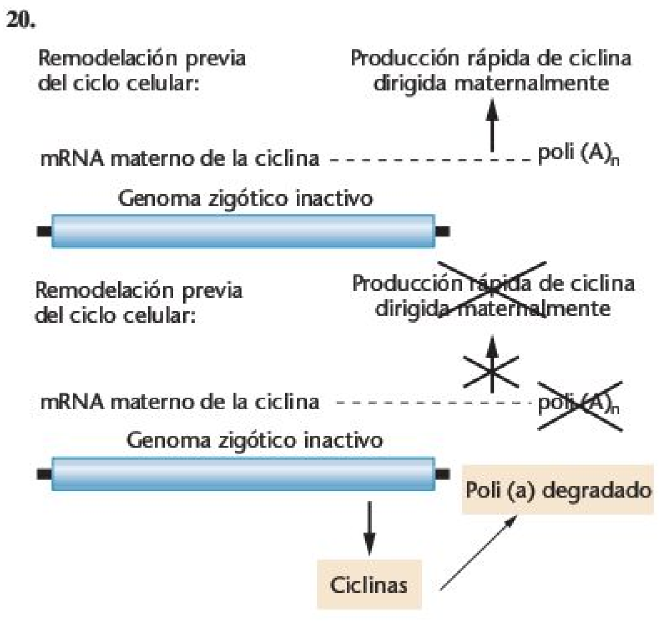
14. Las mutaciones de «ganancia de función» en *Ant* dan lugar a que el gen *Antennapedia* silvestre se exprese en la cabeza y que las moscas mutantes tengan patas en la cabeza en lugar de antenas. Tales mutaciones son a menudo dominantes.

16. Debido a la naturaleza reguladora de los genes *homeóticos* en actividades celulares fundamentales para determinar y diferenciar, sería difícil ignorar su posible impacto sobre la oncogénesis. Los genes homeóticos codifican DNA con dominios de unión que influyen en la expresión génica y cualquier factor que influya en la expresión génica puede, en ciertas circunstancias, influir en el control del ciclo celular.

Sin embargo, este modelo puede ser atractivo, ya que no se ha advertido transformación homeótica en las glándulas mamarias, por lo que la expresión típica de los genes homeóticos en insectos no se manifiesta en tejidos mamarios de acuerdo con Lewis (2000). Se necesitará un número considerable de experimentos para establecer un enlace funcional entre la mutación en los genes homéoticos y la inducción del cáncer. Es probable que los experimentos de mutagénesis y transgénesis sean más productivos para establecer una relación de causa-efecto.

18. Se podrían utilizar dos planteamientos acoplados. Primero, se podrían construir moscas transgénicas con una serie de deleciones que abarcaran a todos los segmentos del mRNA de *bicoid*; la región codificante y las regiones no traducidas $5'$ y $3'$. La comparación de la estabilidad de los individuos, con mRNA delecionados, con los controles indicaría si un segmento particular del mRNA tiene una señal de degradación en la secuencia. Si se localiza por deleción una región sensible a la degradación o secuencia señal, la misma región intacta, cuando se une a una RNA no degradado y no implicado (como una proteína ribosómica o un mRNA de la tubulina) fomentaría la degradación de una manera similar al mRNA de *bicoid*.

20.



22. Dada la información del problema, es probable que este gen controle normalmente la expresión de los genes *BX-C* en todos los segmentos corporales. Los productos de tipo silvestre de *esc* almacenados en el óvulo pueden ser necesarios para interpretar la información almacenada correctamente en el cortex del óvulo.

24. En las flores se conocen tres clases de genes *homeóticos* que son activados en un patrón solapado para especificar diversos órganos florales. Los genes de la clase A dan lugar a sépalos. La expresión de los genes de las clases A y B especifican pétalos, los genes B y C controlan la formación de los estambres y los genes D dan lugar a los carpelos.

26. Debido a que las interacciones señal-receptor dependen de estructura unidas a membranas, la ruta solo se puede trabajar con células adyacentes. La ventaja de tal sistema es que solo serán influenciadas las células en ciertas localizaciones —aquellas que están en contacto. Se produciría una desventaja si se indujera a grandes grupos de células hacia una ruta de desarrollo particular o si las células que no están en contacto necesitaran ser inducidas.

28. Si el producto de *her-1*$^+$ actúa como regulador negativo, entonces cuando el gen es mutante, se pierde la supresión sobre *tra-1*$^+$ y daría lugar a hermafroditismo. Esta hipótesis encaja con la información proporcionada. El doble mutante sería macho porque aun cuando no hay supresión de *her-1*$^+$, no hay producto de *tra-1*$^+$ que apoye el desarrollo del hermafrodita.

Capítulo 24

2. (a) Los *poligenes* son genes que están implicados en determinar la variación continua o caracteres de factores múltiples.

(b) Los *alelos aditivos* explican la influencia hereditaria sobre el fenotipo de un modo aditivo.

(c) La *correlación* es un estadístico que varía de -1 a $+1$ y describe el grado en que la variación de un carácter está asociado con la variación de otro. No implica que exista una relación causa-efecto entre los dos caracteres.

(d) Los *gemelos monozigotos* provienen de un sólo óvulo fecundado y por ello son genéticamente idénticos entre sí. Proporcionan un método para determinar la influencia del genotipo y del ambiente en ciertos caracteres. Los *gemelos dizigotos* surgen de dos óvulos fecundados por dos células espermáticas. Tienen las mismas relaciones genéticas que dos hermanos cualesquiera. El papel del genotipo y del ambiente se puede estudiar comparando la expresión de caracteres en gemelos mozigotos y dizigotos. El mayor valor de concordancia de los gemelos monozigotos cuando se compara con el valor en los gemelos dizigotos indica un componente genético significativo para un carácter dado.

(e) La *heredabilidad* es una medida del grado en que la variación fenotípica de una carácter dado se debe a factores genéticos. Una heredabilidad alta indica que los factores genéticos son los contribuyentes principales de la variación fenotípica, mientras que los factores ambientales tienen menor impacto.

(f) QTL se refiere a Loci de Carácter Cuantitativo (Quantitative Trait Loci), que son situaciones en donde los genes múltiples contribuyen en un carácter cuantitativo.

4. Si se suman los números dados para la proporción, se obtiene el valor de 16, lo que indica que es un cruce dihíbrido. La distribución es la que corresponde a un cruce dihíbrido con efectos aditivos.

(a) Ya que se ha identificado un resultado dihíbrido, hay dos loci implicados en la producción del color. Hay dos alelos en cada locus, con un total de cuatro alelos.

(b, c) Ya que la descripción de rojo, rosa, etc. no nos da indicación de la *cantidad* de color en cualquier tipo de unidad, no seremos capaces de cuantificar realmente en una unidad de cantidad cada cambio de color. Podemos decir que cada gen (alelo aditivo) contribuye con una cantidad igual al fenotipo y los colores difieren entre sí en múltiplos de dicha cantidad unidad. A continuación se da el número de alelos aditivos necesarios para producir cada fenotipo:

1/16 = rojo oscuro	= *AABB*
4/16 = rojo	= 2*AABb*
	2*AaBB*
6/16 = rosa	= *AAbb*
	4*AaBb*
	aaBB
4/16 = rosa claro	= 2*aaBb*
	2*Aabb*
1/16 = blanco	= *aabb*

(d) F_1 = todos rosa claro
F_2 = 1/4 rosa
2/4 rosa claro
1/4 blanco

6. Cuando lea esta pregunta, advierta que las cepas son consanguíneas, por consiguiente homozigotas, y que aproximadamente el 1/250 representa a los grupos más altos y más bajos en la generación F_2. Vea la fórmula $1/4^n$ en el texto.

(a, b) Refiriéndose al texto, vea que cuando cuatro pares de genes actúan aditivamente, la proporción de uno de los fenotipos extremos respecto del número total de descendientes es 1/256 (suma de los números de cada clase fenotípica). Lo mismo se puede decir del otro tipo extremo. Los tipos extremos de este problema son las plantas de 12 cm y de 36 cm. De esta observación, se podría sugerir que hay cuatro pares de genes implicados.

(c) Si hay cuatro pares de genes, hay nueve clases fenotípicas ($2n + 1$) y ocho incrementos entre estas clases. Ya que hay una diferencia de 24 cm entre los extremos, cada incremento supone 24 cm/8 = 3 cm (para cada uno de los alelos aditivos).

(d) Un cruce típico F_1 que da lugar a una distribución «típica» en F_2 se produciría si todos los pares de genes fueran heterozigotos (*AaBbCcDd*), aditivos y con transmisión independiente. Hay muchos grupos posibles de padres que darían una F_1 de este tipo.

La limitación es que cada padre tenga un genotipo con una altura de 24 cm como se indica en el problema. Ya que los padres son consanguíneos, se espera que todos sean homozigotos. Un ejemplo:

AABBccdd × *aabbCCDD*

(e) Ya que el genotipo *aabbccdd* da lugar a una altura de 12 cm y cada alelo en mayúscula añade 3 cm a la altura, hay muchas posibilidades para una planta de 18 cm:

AAbbccdd
AaBbccdd
aaBbCcdd, etc.

Cualquier planta con siete letras mayúsculas tendrá 33 cm de altura:

AABBCCDd,
AABBCcDD,
AABbCCDD, como ejemplos.
AABbcc × *aabbcc*

Gametos	***Gameto***	***Offspring***
(18 cm tail)	*(6 cm tail)*	
ABc	*abc*	*AaBbcc* (14 cm)
Abc		*Aabbcc* (10 cm)

8. Para la altura, advierta que las diferencias promedio entre gemelos MZ criados juntos (1,7 cm) y los criados aparte (1,8 cm) son similares (indicando pequeñas influencias ambientales) y considerablemente menores que las diferencias con gemelos DZ (4,4 cm) o hermanos cualesquiera (4,5 cm) criados juntos. Estos datos indican que la genética juega un papel esencial en la determinación de la altura. Sin embargo, para el peso, advierta que los gemelos MZ tienen unas diferencias mucho menores (1,9 Kg) que los gemelos MZ criados a parte, indicando que el ambiente tiene un considerable impacto en el peso. Comparando las diferencias en el peso de gemelos MZ criados aparte y gemelos DZ y hermanos cualesquiera criados juntos se puede concluir que el ambiente tiene casi tanta influencia sobre el peso que la genética. Para el número de crestas, las diferencias entre gemelos MZ criados juntos y criados aparte son pequeñas. De los datos de la tabla, parece que el número de crestas y la altura tienen los mayores valores de heredabilidad.

10. Muchos caracteres, especialmente aquellos que vemos como cuantitativos, están probablemente determinados por poligenes con posibles influencias ambientales. Los siguientes son ejemplos corrientes: la altura; la estructura general corporal; el color de la piel; y quizás los más comunes, caracteres de comportamiento, incluida la inteligencia.

12. (a) Utilizando las siguientes ecuaciones, H^2 y h^2 se pueden calcular como sigue.

Para la grasa del lomo:
Heredabilidad en sentido amplio = $H^2 = 12{,}2/30{,}6 = 0{,}398$
Heredabilidad en sentido estricto = $h^2 = 8{,}44/30{,}6 = 0{,}276$

Para la longitud del cuerpo
Heredabilidad en sentido amplio = $H^2 = 26{,}4/52{,}4 = 0{,}504$
Heredabilidad en sentido estricto = $h^2 = 11{,}7/52{,}4 = 0{,}223$

(b) En mejora animal y vegetal, una medida de la respuesta potencial a la selección basada en las varianzas aditiva y de la dominancia se denomina heredabilidad en sentido estricto (h^2). Una relativamente alta heredabilidad en sentido estricto es una predicción del impacto que la selección puede tener alterando una población inicial con apareamiento aleatorio. Por consiguiente, de los dos caracteres, la selección por la grasa del lomo obtendría más respuesta.

14. (a) Para la vitamina A

$$h_A^2 = V_A/V_P = V_A/(V_E + V_A + V_D) = 0{,}097$$

Para el colesterol $h_A^2 = 0{,}223$

(b) El contenido en colesterol estaría muy influenciado por selección.

16. Dado que ambos valores de la heredabilidad en sentido estricto son relativamente altos, es probable que el ganadero pueda alterar tanto el contenido proteico de la leche como el contenido graso por selección. El valor de 0,91 para el coeficiente de correlación entre el contenido proteico y el graso sugiere que si se selecciona por contenido graso, el contenido proteico aumentará. Sin embargo, los coeficientes de correlación describen el grado en el que la variación de un carácter cuantitativo está asociada con la variación de otro y no revela las causas subyacentes de tal variación. Asumiendo que estas vacas lecheras se han seleccionado por alto contenido en grasa en el pasado y que el contenido proteico se ha incrementado con la selección (por contenido graso), es probable que la selección por contenido graso continúe correlacionado con el incremento en contenido proteico. Sin embargo, puede muy bien haber un punto en el que las circunstancias fisiológicas cambien y la selección por alto contenido graso pueda ser a expensas del contenido proteico.

18. Dado el valor de heredabilidad realizada de 0,4, es improbable que experimentos de selección den lugar a una respuesta rápida y/o significativa. Una intensa selección podría dar lugar a una menor respuesta.

20. Ya que las plantas de arroz son genéticamente idénticas, V_G es cero y $H^2 = V_G/V_P$ = cero. La heredabilidad en sentido amplio es una medida del efecto de los factores genéticos sobre la varianza fenotípica. En este caso, con plantas genéticamente idénticas, H^2 es cero, y la varianza observada en la producción de grano se debe al ambiente. La selección no sería efectiva en esta variedad de arroz.

22. (a) La explicación más directa sería dos pares de genes, contribuyendo cada gen aditivo con unos 1,2 mm al fenotipo.

(b) El ajuste con este cruce retrógrado apoya la hipótesis original.

(c) Estos datos no apoyan la sencilla hipótesis proporcionada en la parte (a).

(d, e) Con estos datos, no se pueden distinguir clases fenotípicas sugiriendo que el ambiente puede jugar un papel en el desarrollo del ojo o que hay más genes implicados.

24. Para caracteres como el tipo sanguíneo, el color de los ojos y el retraso mental, hay una diferencia bastante significativa entre los grupos de MZ y DZ y por consiguiente un elevado componente genético. Sin embargo, para el sarampión, la diferencia no es tan significativa, indicando un mayor papel del ambiente. El color del pelo tiene un componente genético significativo, como la epi-

lepsia idiopática, esquizofrenia, diabetes, alergia, labio partido y pie zambo. El componente genético para el cáncer de mama está presente, pero es mínimo de acuerdo con estos datos.

26. Como con muchos caracteres que están ocasionados por numerosos loci actuando aditivamente, algunos genes tienen más influencia sobre la expresión que otros. Además, los factores ambientales pueden jugar un papel en la expresión de algunos caracteres poligénicos. En el caso de la braquidactilia, hay numerosos genes modificadores en el genoma que pueden influir en la expresión de la braquidactilia. El examen de la OMIM (*Online Mendelian Inheritance of Man*) en *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/* ilustrará este punto.

28. Es probable que las moscas mantenidas en el laboratorio de la Universidad sean más consanguíneas y menos heterozigotas que las capturadas recientemente en la naturaleza. La respuesta a la selección depende de la variación genética. A mayor variación genética en una especie es más probable una marcada respuesta a la selección. Por consiguiente se esperaría una mayor respuesta a la selección en poblaciones silvestres.

30. Los mejoradores intentan eliminar por «selección» esta anomalía manteniendo primero un completo y detallado registro de las cepas afectadas. Segundo, evitan cruzar perros cuyos parientes próximos esten afectados. Se desconocen los mecanismos moleculares de desarrollo que dan lugar al efecto del «mes del nacimiento» en la displasia de cadera canina. Sin embargo, en muchos, y quizás en todos, los caracteres cuantitativos, está claro que hay una significativa influencia ambiental, tanto en la penetración como en la expresión del fenotipo. Cuando hay muchos genes que están actuando en varias rutas para influir en el fenotipo, hay oportunidades para variados microambientes moleculares y de desarrollo dentro del organismo. Indicado de otra manera, cuanto mayor y más compleja sea la distancia molecular entre el genotipo y el fenotipo, habrá mayor probabilidad de que estén implicados factores ambientales en su expresión.

Capítulo 25

2.

$$\begin{aligned} p &= \text{frecuencia de A} \\ &= 0{,}2 + 0{,}3 \\ &= 0{,}5 \\ q &= 1 - p = 0{,}5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Frecuencia de } AA &= p^2 \\ &= (0{,}5)^2 \\ &= 0{,}25 \text{ o el } 25\% \\ \text{Frecuencia de } Aa &= 2pq \\ &= 2(0{,}5)(0{,}5) \\ &= 0{,}5 \text{ o el } 50\% \\ \text{Frecuencia de } aa &= q^2 \\ &= (0{,}5)^2 \\ &= 0{,}25 \text{ o el } 25\% \end{aligned}$$

4. A fin de aplicar la ecuación de Hardy-Weinberg, la población tiene que estar en equilibrio.

6. Ya que el problema presenta los datos en porcentajes, no es posible utilizar el análisis de χ^2, ya que se necesitarían valores absolutos de los distintos genotipos. No obstante, para poder sacar alguna conclusión podríamos suponer que hemos tomado una muestra de 10.000 individuos, por lo que,

(a) Los valores en el equilibrio serían como sigue:

$$\text{Frecuencia de } 1\ (p) = (6.000 + \tfrac{1}{2}\,3.510)/10.000 = 0{,}7755$$
$$\text{Frecuencia de } \Delta 32\ (q) = (490 + \tfrac{1}{2}\,3.510)/10.000 = 0{,}2245$$

$$\begin{aligned} \text{Frecuencia de } l/l &= p^2 = (0{,}7755)^2 \\ &= 0{,}6014 \text{ o } 60{,}14\% \\ \text{Frecuencia de } l/\Delta 32 &= 2pq \\ &= 2(0{,}7755)(0{,}2245) \\ &= 0{,}3482 \text{ o } 34{,}82\% \\ \text{Frecuencia de } \Delta 32/\Delta 32 &= q^2 = (0{,}2245)^2 \\ &= 0{,}0504 \text{ o } 5{,}04\% \end{aligned}$$

La comparación de estos valores de equilibrio con la supuesta muestra de 10.000 individuos sugiere que los valores se habrían obtenido de una población en equilibrio.

(b) Los valores en el equilibrio serán los siguientes:

$$\text{Frecuencia de } A\ (p) = (7.560 + \tfrac{1}{2}\,2.420)/10.000 = 0{,}877$$
$$\text{Frecuencia de } S\ (q) = (20 + \tfrac{1}{2}\,2.420)/10.000 = 0{,}123$$

$$\begin{aligned} \text{Frecuencia de } AA &= p^2 = (0{,}877)^2 \\ &= 0{,}7691 \text{ o } 76{,}91\% \\ \text{Frecuencia de } AS &= 2pq = 2(0{,}877)(0{,}123) \\ &= 0{,}2157 \text{ o } 21{,}57\% \\ \text{Frecuencia de } SS &= q^2 = (0{,}123)^2 \\ &= 0{,}0151 \text{ o } 1{,}51\% \end{aligned}$$

La comparación de estos valores de equilibrio con la supuesta muestra de 10.000 individuos sugiere que los valores no están en equilibrio. Advierta que hay más heterozigotos (2.420) que los previstos (2.157) y menos tipos *SS*.

Para comprobar el equilibrio de Hardy-Weinberg con estas supuestas muestras, se aplica la prueba de ji cuadrado como sigue:

$$\chi^2 = \frac{\Sigma(o - e)^2}{e}$$

(a) $(6.000 - 6.014)^2/6.014 + (3.510 - 3.482)^2/3.482 + {} + (490 - 504)^2/504 = 0{,}64$

(b) $(7.560 - 7.691)^2/7691 + (2420 - 2157)^2/2157 + {} + (20 - 15{,}1)^2/15{,}1 = 35{,}9$

Al calcular los grados de libertad en una comprobación de frecuencias génicas, las «variables libres» se reducen en un grado de libertad adicional debido a que uno de los parámetros (p o q) se estima al determinar los valores esperados. Por consiguiente tenemos un grado de libertad, aun cuando haya tres clases. Comprobando en la tabla de χ^2 con un grado de libertad da un valor de 3,84 al nivel de probabilidad del 0,05.

En el primer grupo de datos el valor del χ^2 calculado es mucho menor, por lo que se confirma la hipótesis nula (los supuestos valores observados se diferencian de los valores en el equilibrio sólo por azar).

Sin embargo, en el segundo grupo de datos, el valor del χ^2 es casi diez veces mayor, por lo que, si se hubiera tomado una muestra de 10.000 individuos, podríamos afirmar que las frecuencias de *AA*, *AS* y *SS* de la población no están en equilibrio.

8. La siguiente fórmula calcula la frecuencia de un alelo en la generación siguiente en cualquier escenario selectivo, dadas las frecuencias de a y A en esta generación y la eficacia de los tres genotipos.

$$q_{g+1} = [w_{Aa}p_g q_g + w_{aa}q_g^2]/[w_{AA}p_g^2 + w_{Aa}2p_g q_g + w_{aa}q_g^2]$$

en donde q_{g+1} es la frecuencia del alelo a en la generación siguiente, q_g es la frecuencia del alelo a en esta generación, p_g es la frecuencia del alelo A en esta generación y cada «w» representa la eficacia de sus respectivos genotipos.

(a) $q_{g+1} = [0{,}9(0{,}7)(0{,}3) + 0{,}8(0{,}3)^2]/[1(0{,}7)^2 + 0{,}9(2)(0{,}7)(0{,}3) + 0{,}8(0{,}3)^2]$

$q_{g+1} = 0{,}278 \quad p_{g+1} = 0{,}722$

(b) $q_{g+1} = 0{,}289 \quad p_{g+1} = 0{,}711$

(c) $q_{g+1} = 0{,}298 \quad p_{g+1} = 0{,}702$

(d) $q_{g+1} = 0{,}319 \quad p_{g+1} = 0{,}681$

10. Ya que un gen letal dominante es eliminado por selección, es improbable que exista en una frecuencia elevada. Sin embargo, si el gen muestra penetración incompleta o se manifiesta tardíamente (después de la edad de reproducción) puede permanecer en la población.

12. Lo que se debe hacer en este problema es predecir la probabilidad de que uno cualquiera de los bisabuelos sea heterozigoto. Dado que la frecuencia del trastorno en la población es de 1 en 10.000 individuos (0,0001), entonces $q^2 = 0{,}0001$ y $q = 0{,}01$. La frecuencia de los heterozigotos es $2pq$, o aproximadamente 0,02, tal como indica el enunciado problema.

Por consiguiente, la probabilidad de que el bisabuelo sea portador del alelo para el trastorno recesivo es 0,02 y de que el biznieto reciba dicho alelo solo de su bisabuelo, tanto a través de su madre como de su padres, es

$$0{,}02 \times (1/2)^6 = 0{,}0003125 \text{ de ser homozigoto}$$

De la misma manera, el biznieto también podrá ser homozigoto por su bisabuela, por lo que sumaremos las dos probabilidades, $0{,}0003125 + 0{,}0003125 = 0{,}000625$.

Además, el biznieto tiene la probabilidad de recibir el alelo recesivo tanto de su bisabuelo como de su bisabuela, es decir

$$[0{,}02 \times (1/2)^2] \times [0{,}02 \times (1/2)^2] = 0{,}00025 \text{ de ser homozigoto}$$

Luego, finalmente, tendremos $0{,}000625 + 0{,}000025 = 0{,}00065$. Esta probabilidad es 6,5 veces superior a la probabilidad de que un individuo cualquiera de la población manifieste el trastorno (0,0001).

14. Aunque la heterozigosis tiende a enmascarar la expresión de los genes recesivos, que puede ser deseable en un animal o planta domesticada, a menudo se utilizan protocolos de cruces para obtener cepas homozigotas, por lo que se podrán expresar los genes recesivos. Además, suponga que un carácter particularmente deseable se encuentra en una planta o animal domesticado. La mejor forma de aumentar la frecuencia de los individuos con dicho carácter es autofecundando (a menudo no es posible) o por cruzamiento entre parientes (consanguinidad). En teoría, se aumenta la probabilidad de que un gen «se encuentre a si mismo» en distintos esquemas de cruce. Hay desventajas en incrementar el grado de homozigosis por consanguinidad. La *depresión consanguínea* es una reducción en la eficacia, asociada a menudo con un aumento de la homozigosis.

16. El modo más rápido de generar líneas homozigotas en un organismo es la *autofecundación*. Ya que no siempre es posible, a menudo se usa el cruce hermano con hermana.

18. Si hubiera dos varones con hemofilia, $q = 2/2.000$ y $p = 1.998/2.000$. La frecuencia de mujeres heterozigotas sería $2pq$ o $2(1.998/2.000 \times 2/2.000) = 0{,}001998$. El número de mujeres heterozigotas sería 3,996, o aproximadamente 4.

20. Ya que tres de los niños afectados tienen padres afectados, solo dos genes «nuevos», por mutación, entran en el problema. El gen es dominante; por consiguiente, cada nuevo caso de acondroplasia aparece a partir de una sola mutación nueva. Hay 50.000 nacimientos, por consiguientes están implicados 100.000 gametos (genes). Por consiguiente, la frecuencia de mutación es: 2/100.000 o 2×10^{-5}.

22. Ya que $r1 = 0{,}81$ y $r2 = 0{,}19$, la frecuencia esperada de heterozigotos sería $2pq \times 125$ ó $2(0{,}81 \times 0{,}19) \times 125 = 38{,}475$. Dada la siguiente ecuación y sustituyendo:

$$F = (H_e - H_o)/H_e$$
$$F = (38{,}475 - 20)/38{,}475 = 0{,}48$$

24. La distribución de genotipos siguiente se produce en 50 carneros de cuernos grandes, en donde el alelo normal dominante C da lugar a lana lisa.

CC = 29 = lana lisa
Cc = 17 = lana lisa
cc = 4 = lana rizada

Calculando, $p = (21 \times 29 + 17) = 75$ o 0,75 y $q = (21 \times 4 + 17) = 25$ o 0,25. Las frecuencias esperadas de los heterozigotos es $2pq = 0{,}375$. Ya que los heterozigotos observados son 17/50 = 0,34, aplicamos la siguiente ecuación:

$$F = (H_e - H_o)/H_e$$
$$F = (0{,}375 - 0{,}34)/0{,}375 = 0{,}093$$

Este problema también se podría resolver el número real de carneros de cada clase, en donde habría $2pq \times 50 = 18{,}75$ heterozigotos esperados:

$$F = (18{,}75 - 17)/18{,}75 = 0{,}093$$

26. (a) Es probable que el gen sea recesivo ya que todos los individuos afectados tienen padres no afectados y la anomalía va claramente por familias. Para la población, ya que $q^2 = 0{,}002$, entonces $q = 0{,}045$, $p = 0{,}955$ y $2(pq) = 0{,}086$. Para la comunidad, ya que $q^2 = 0{,}005$, $q = 0{,}07$, $p = 0{,}93$ y $2(pq) = 0{,}13$.

(b) Probablemente este actuando aquí el «efecto fundador». Poblaciones locales, relativamente pequeñas que están relativamente aisladas en sentido reproductivo, tienden a mostrar diferencias en las frecuencias génicas cuando se las compara con poblaciones grandes. En tales poblaciones pequeñas, la homozigosis aumenta debido a que un gen tiene una mayor probabilidad de «encontrarse a sí mismo».

Capítulo 26

2. Una especie es un grupo de poblaciones que se cruzan entre sí real o potencialmente y que está aislada reproductivamente de todos los otros grupos. La especiación es un proceso que lleva a la formación de especies. La evolución es el cambio en una po-

blación con el tiempo. La especiación es uno de los muchos resultados de la evolución.

4. Los organismos pueden parecer similares pero estar reproductivamente aislados por un tiempo suficiente para justificar su identidad como especie. Si se producen diferencias genéticas significativas, pueden considerarse especies distintas.

6. Los nichos subterráneos son menos amplios y dinámicos que los exteriores. Los microhabitats subterráneos constan de un rango de cambios climáticos más reducidos, por lo que el polimorfismo genético no se selecciona. Esta conclusión viene apoyada por otros estudios que indican que la diversidad genética está positivamente correlacionada con la amplitud del nicho.

8. Los resultados de estudios de laboratorio indican que fue una ventaja selectiva tener dos inversiones en lugar de una. Así, la selección natural favoreció el mantenimiento de ambas inversiones sobre la pérdida de cualquiera de ellas.

10. (a) Las mutaciones de cambio de sentido dan lugar a cambios en los aminoácidos.
(b) La transferencia horizontal se refiere al proceso de pasar información genética de un organismo a otro sin producir descendientes. En las bacterias, la transferencia de plásmidos es un ejemplo de transferencia horizontal.
(c) El hecho de que ninguno de los aislados comparta cambios de nucleótidos idénticos indica que hay poco intercambio entre especies distintas. Cada alteración es única, originada muy probablemente en una cepa ancestral y mantenida sólo en los descendientes de dicha cepa.

12. La semejanza aproximada de las tasas de mutación entre genes y linajes proporcionaría unas estimas más creíbles de tiempos de divergencia entre especies y permitiría una más amplia interpretación de la comparación de las secuencias. También proporciona una mejor comprensión del proceso mutacional que gobierna la evolución entre los genomas de mamíferos. Por ejemplo, si la tasa de mutación es bastante constante entre linajes o células, las cuales tienen una renovación más rápida, indica que los errores relacionados con las replicación no contribuyen significativamente a las tasas de mutación.

14. En general, la especiación implica una acumulación gradual de cambios genéticos hasta un punto en el que se produce un aislamiento reproductivo. Dependiendo de las condiciones ambientales o geográficas, los cambios genéticos se pueden producir rápida o lentamente. Pueden implicar cambios puntuales o cromosómicos.

16. Los mecanismos de aislamiento reproductivo se agrupan en prezigóticos y postzigóticos, e incluyen los de la lista de más abajo. Vea el texto para ejemplos e ilustraciones específicos.
Geográfico o ecológico
Estacional o temporal
De comportamiento
Mecánico
Fisiológico
Esterilidad de los híbridos por el desarrollo
Esterilidad de los híbridos por la segregación
Colapso de la F_2

18. Cabría esperar que las plantas poliploides que se originan por el cruce de dos especies fueran más heterozigotas que las especies paternas diploides, debido a que se han combinado dos genomas distintos. En general, la variación genética es una ventaja a menos que un grado significativo de dicha variación sobrepase la tolerancia fisiológica aceptable.

20. La terapia génica somática, como cualquier terapia permite a algunos individuos vivir unas vidas más normales que aquellos que no reciben terapia. Como tal, la capacidad de tales individuos para contribuir al conjunto de genes, aumenta la probabilidad de que genes menos aptos entren y se mantengan en el conjunto de genes. Esta es una consecuencia normal de la terapia, sea genética o no, y frente al control y prevención de las enfermedades, la sociedad ha aceptado normalmente estas consecuencias. La terapia de la línea germinal, si tuviera éxito, podría dar lugar a una limitada, aislada y rara eliminación de un gen de un linaje génico. Sin embargo, dado el presente estado de la ciencia, su impacto sobre el curso de la evolución humana se diluirá y anulará por un sinnúmero de otros factores que afligen a la humanidad.

22. Enfoque este problema escribiendo los codones posibles de todos los aminoácidos (excepto Arg y Asp que no presentan cambios) de la cadena de citocromo c humana. Luego determine el número mínimo de sustituciones nucleotídicas necesario para que cada aminoácido cambie en los distintos organismos. Una vez confeccionada la lista, cuente el numero para cada organismo: caballos, 3; cerdos, 2; perros, 3; gallinas, 3; ranas, 2; hongos, 6.

24. La clasificación de los organismos en especies distintas se basa en evidencias (morfológicas, genéticas, ecológicas, etc.) de que están aislados reproductivamente. Es decir, tiene que haber evidencias de que no hay flujo génico entre los grupos que llamamos especies distintas. La clasificación por encima del nivel de especie (género, familia, etc.) no se basa en dichos datos empíricos. Realmente, la clasificación por encima de la especie s algo arbitraria y se basa en tradiciones que se extienden más allá de la información que da la secuencia del DNA. Además, recuerde que la divergencia en la secuencia del DNA no siempre es directamente proporcional a la divergencia morfológica, ecológica o de comportamiento. Aunque la clasificación en géneros proporcionada en este problema parece válida, otros factores, mucho más allá de la simple secuencia del DNA, tienen que considerarse en la clasificación. Cuanta más información se obtenga del significado de las diferencias en secuencia del DNA (ΔT_m) en comparación con los factores morfológicos, será posible reconsiderar muchas relaciones filogenéticos y es posible que sean necesarios ajustes en algunos esquemas de clasificación.

26. (a) Ya que las regiones genómicas no codificantes probablemente son genéticamente silenciosas, es probable que contribuyan muy poco, si es que lo hacen, al fenotipo. La selección actúa sobre el fenotipo, por consiguiente tales regiones no codificantes son probablemente neutras selectivamente.
(b) Estos datos sobre el polimorfismo indican que todos los cíclidos del área del lago Victoria (el lago y los ríos tributarios) están emparentados por ascendencia reciente, mientras que los de los lagos vecinos están emparentados a mayor distancia. Además, ya que el lago Victoria se secó hace unos 14.000 años, es probable que fuera repoblado por una muestra relativamente pequeña de cíclidos.

28. El patrón de distancia genética a lo largo del tiempo indica que desde hace unos 25.000 años hasta el presente, los humanos modernos y los cromañones presentan diferencias aproximadamente constantes. Por el contrario, hay un aumento brusco de distancia

genética cuando se compara a los humanos modernos y los cromañones con los neandertales. Los resultados indican una clara discontinuidad entre los humanos modernos, los cromañones y los neandertales con respecto a la variación genética de muestras de DNA mitocondrial. Suponiendo que el muestreo y las técnicas analíticas utilizadas para generar los datos son validas, parece que los neandertales hicieron muy poca contribución genética, si es que la hicieron, al conjunto de genes del cromañon o del europeo moderno. Se puede argüir que la ausencia de linajes de mtDNA neandertal en humanos actuales es consecuencia de la deriva o de la extinción de linajes desde la desaparición de los neandertales. Sin embargo, el examen de mtDNA antiguo de cromañon no presenta evidencias de una relación histórica y sugiere que los neandertales no estuvieron emparentados genéticamente con los antecesores de los humanos modernos.

Capítulo 27

2. La frecuencia del gen letal en la población cautiva ($q^2 = 5/169$ y $q = 0{,}172$) es aproximadamente el doble que la del conjunto de genes global ($q = 0{,}09$). Aplicando la fórmula

$$q_n = q_o/(1 + nq_o)$$

se puede estimar que se tardarían 10 generaciones en reducir la frecuencia del gen letal a 0,063 en la población cautiva, sin ninguna intervención (se supone apareamiento al azar). Ya que los cóndores producen muy pocos huevos por año, parece justificado un planteamiento más práctico.

(a, b) Primero, si se tienen registros detallados del sistema de cruces de las aves cautivas, entonces se podrían conocer a los heterozigotos. Se podrían establecer programas de cruces para restringir aquellos que llevan el gen letal. Tal «gestión del parentesco» se utiliza a menudo en poblaciones cautivas. Si no están disponibles los registros del parentesco, a menudo es posible establecer parentescos utilizando marcadores genéticos como el polimorfismo de microsatélites del DNA. Utilizando tales marcadores se puede identificar a menudo parejas y ligarlos a sus descendientes.

Acoplando el conocimiento de las parejas con la probabilidad de producir una combinación génica letal, los cruces selectivos se pueden utilizar a menudo para minimizar la influencia de un gen deletéreo. Además, tales marcadores se pueden usar para establecer cruces que optimicen la mezcla genética, reduciendo así la depresión consanguínea.

4. Tanto la deriva como la consanguinidad tienden a llevar a las poblaciones a la homozigosis. La deriva genética es más corriente cuando el tamaño de apareamiento efectivo de la población es bajo. Cuando prevalece esta situación, la consanguinidad es también más probable. Son diferentes en el sentido de que la consanguinidad se puede dar cuando ciertas estructuras poblacionales o de comportamiento favorecen los cruces entre parientes, independientemente del tamaño poblacional efectivo. La consanguinidad tiende a aumentar la frecuencia de las dos clases homozigotas a expensas de la clase heterozigota. La deriva genética puede dar lugar a la fijación de uno u otro alelo, dando lugar a una sola clase de homozigotos.

6. La depresión consanguínea, con el tiempo, reduce la frecuencia de heterozigotos, normalmente una ventajosa cualidad selectiva de la especie. Cuando aumentan los homozigotos (por pérdida de los heterozigotos) es probable que los alelos deletéreos lleguen a ser una mayor carga de la población. La depresión no consanguínea ocurre cuando hay una reducción de la eficacia en los descendientes con individuos genéticamente diversos. Normalmente se atribuye a que los descendientes están menos adaptados a las condiciones ambientales locales que los padres. A un cuando sea necesario forzar la disminución de consanguinidad para salvar a especies amenazadas, cuando el tamaño poblacional es bajo, cambia significativa y permanentemente la constitución genética de las especies.

8. A menudo, las pruebas moleculares para la heterozigosis global pueden indicar el grado de consanguinidad y/o deriva genética. Como hay consanguinidad (y deriva genética en este caso), el grado de heterozigosis disminuye. Un alelo cuya frecuencia esté dictada por la consanguinidad no estará influenciado en exclusiva. Es decir, también otros alelos estarán caracterizados por la disminución de heterozigosis. Así, si el genoma en general tiene relativamente un alto grado de heterozigosis, es probable que el gen esté influenciado por selección, en lugar de por consanguinidad y/o deriva genética.

10. En general, las especies amenazadas se capturan y se crían en un ambiente artificial hasta que se consigue un número poblacional suficiente para asegurar la supervivencia de la especie. A continuación, se aplican estrategias de gestión genéticas para cruzar a los individuos de tal modo que aumente la heterozigosis tanto como sea posible. Si se trata de plantas, se utilizan a menudo bancos de semillas para mantener y facilitar su supervivencia a largo plazo.

12. Las alozimas son variantes de un alelo dado, que a menudo se detectan por electroforesis. Tal variación puede tener o no impacto en la eficacia de un individuo. A mayor variación de alozimas, más heterogéneos serán genéticamente los individuos. En general se está de acuerdo en que tal diversidad genética es esencial para la supervivencia a largo plazo. Siendo todos los otros factores iguales, la variación alozímica es más probable que refleje variación fisiológica que la variación de los RFLP, debido a que las regiones RFLP no se encuentran necesariamente en regiones del genoma codificadoras de proteínas. Los RFLP permiten detectar cantidades muy pequeñas de variación genética en una población, y es improbable encontrar un organismo que no sea de alguna manera variable en términos de los RFLP con respecto a otros organismos (dentro y entre especies).

14. (a) La probabilidad de ser heterozigoto es $2pq = 2(0{,}99)(0{,}01) = 0{,}0198$. Multiplicando este valor por 20 nos da la probabilidad de ser heterozigoto:

$$0{,}0198 \times 20 = 0{,}396$$

(b) Para determinar *Ne* utilice la expresión:

$$\begin{aligned} N_e/N &= 0{,}42 \\ N_e &= 0{,}42 \times 50 = 21 \\ H_t &= (1 - 1/2N_e)^t H_o \\ &= (1 - 1/42)^5 \times 0{,}0198 \\ &= 0{,}01755 \\ H_t/H_o &= 0{,}01755/0{,}0198 = 0{,}886 \end{aligned}$$

Por consiguiente, hay aproximadamente una perdida de heterozigotos de 11,4% después de cinco generaciones.

16. (a) Primero, será necesario determinar si el hábitat nativo en las estepas asiáticas en la década de 1920 es adecuada para su introducción. Si el rango original es adecuado para su reintroducción, hay que tener cuidado en introducir caballos con la máxima diversidad genética posible. Para hacerlo así, se debe controlar los patrones de RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos) u otros indicadores de diversidad genética.

(b) Ya que el grupo fundador incluía una yegua doméstica, para introducirlos puede ser deseable seleccionar aquellos que sean genéticamente lo menos parecido posible a la yegua doméstica. Puede ser adecuado soltar grupos de tamaño razonable en localidades distintas dentro del rango, para incrementar finalmente diversidad genética.

18. Desde el punto de vista fisiológico, la preservación criogénica en nitrógeno líquido puede permitir el almacenamiento de semillas de algunas especies durante 100 años o más; sin embargo tan sofisticado almacenamiento solo se puede realizar con una pequeña fracción de las semillas. Así, semillas de muchas especies se pierden en el almacenamiento, lo que disminuye la diversidad genética. Semillas de plantas tropicales son algo menos tolerantes al almacenamiento en frío y tienen que regenerarse frecuentemente, una práctica que es propensa a la pérdida de diversidad genética por deriva genética. En cada regeneración solo se puede usar un número pequeño de semillas, y la disminución del tamaño de la muestra (a menudo por debajo de las 100 plantas) reduce la diversidad genética. Para contrarrestar algo este problema, las plantas se cultivan en condiciones óptimas para reducir la selección. Otro problema con las semillas preservadas es la acumulación de mutaciones deletéreas, tanto como resultado del almacenamiento como de la regeneración. Algunos estudios indican un aumento en la frecuencia de lesiones cromosómicas y del mtDNA, mutaciones de deficiencia de la clorofila y disminución de la actividad de la polimerasa del DNA asociado con el almacenamiento de las semillas a largo plazo.

20. El intervalo más largo entre el cuello de botella y la actualidad se dio en los guepardos y se podría esperar que los guepardos presentaran el mayor grado de polimorfismo de microsatélites. El intervalo más corto entre el cuello de botella y la actualidad se dio en los leones de Gir Forest, por lo que se podría esperar que tuvieran el menor polimorfismo. Los datos de Driscoll et al. (2002 *Genome Research* 12:414-423) incluyen las siguientes estimaciones del polimorfismo de los microsatélites en los tres grupos de felinos mencionados anteriormente: guepardos (84,1%), pumas (42,9%) y leones de Gis Forest (19,3%).

22. (a) La especie con la mayor variabilidad genética, estimada con estos marcadores, es la del gato doméstico. Los gatos domésticos comparten un inmenso y variable conjunto de genes. Su sorprendente número y su comportamiento no consanguíneo les permite mantener un elevado grado de variabilidad genética.

(b) Los leones tienen la menor variabilidad genética.

(c) Ya que las alozimas codifican proteínas y las proteínas proporcionan a menudo funciones significativas en un organismo, la selección es más fuerte y las mutaciones son menos toleradas. Se esperaría que la selección fuera más fuerte en segmentos de DNA que están relacionados con la función. Además, por su naturaleza, los microsatélites y minisatélites son más mutables.

24. Aunque las especies insignia (a menudo grandes mamíferos) es posible que recojan considerable apoyo y fondos públicos, pueden reducir el apoyo a especies que pueden tener un mayor impacto en una comunidad de especies. Los productores primarios (las plantas) son componentes necesarios de un hábitat diverso y solidario. Si uno se centra en especies insignia en una zona, es posible que en otras zonas se sufra mucho debido a que las especies fundacionales se pierden. Utilizar especies paraguas en una gran área geográfica con la esperanza de proteger a otras especies de dicha área es un planteamiento razonable. Sin embargo, el tamaño de una zona no es necesariamente el factor primario para determinar el éxito de la especies. La diversidad y productividad de un hábitat son las mayores contribuciones al éxito de las especies. Ya que la tierra esta muy solicitada, puede ser inteligente a largo plazo seleccionar especies paraguas en hábitats diversos y productivos en lugar de tener en cuenta el tamaño del terreno. Seleccionando grupos de especies que presentan considerable biodiversidad, se incrementa la probabilidad de proteger un hábitat suficientemente rico como para albergar muchas especies. Tales hábitats tienen a menudo un considerable valor económico, siendo su disponibilidad limitada.

Créditos

Principios

p. ii, iii Richard Megna/Fundamental Photographs; **p. ix** Dr. Andrew S. Bajer, University of Oregon; **p. x top** Dr. Andrew S. Bajer, University of Oregon; **p. x bottom** Malcolm Gutter/Visuals Unlimited; **p. xi top** B. John Cabisco/Visuals Unlimited; **p. xi bottom** Dr. L. Caro/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. xii top** M. Wurtz/Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. xii bottom** Marc Henrie © Dorling Kindersley; **p. xiii top** Sovereign/Phototake NYC; **p. xiii bottom** Tania Midgley/Corbis/Bettmann; **p. xiv top** Jean Claude Revy/Phototake NYC; **p. xiv bottom** Ventana Medical Systems Inc.; **p. xv top** Dr. Gopal Murti/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. xv bottom** Image courtesy of Brian Harmon and John Sedat, University of California, San Francisco; **p. xvi top** MaizeGDB/Courtesy M.G. Neuffer; **p. xvi bottom** Reprinted from the front cover of Science, Vol. 292, May 4, 2001 Crystal structure of a Thermus thermophilus 70S ribosome containing three bound transfer RNAs(top) and exploded views showing its different molecular components (middle and bottom). Image provided by Dr. Albion Baucom (baucom@biology.ucsc.edu). Copyright American Association for the Advancement of Science; **p. xvii top** Dr. Andrew S. Bajer, University of Oregon; **p. xvii bottom** CNRI/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. xviii top** Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. xviii bottom** Dr. Gopal Murti/Photo Researchers, Inc.; **p. xix top** SPL/Photo Researchers, Inc.; **p. xix bottom** Dr. Andrew S. Bajer, University of Michael Gabridge/Visuals Unlimited; **p. xx** Alfred Pasieka/SPL/Photo Researchers, Inc.; **p. xxi top** Dr. Stanley Flegler/Visuals Unlimited; **p. xxi bottom** Photo courtesy of Roslin Institute; **p. xxii** Edward B. Lewis, California Institute of Technology; **p. xxiii** Edward S. Ross, California Academy of Sciences.

Capítulo 1: Introducción a la Genética

p. 1, CO1 Omikron/Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 3, 1.1** Malcolm Gutter/Visuals Unlimited; **p. 3, 1.2** Biophoto Associates/Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 3, 1.3** Sovereign/Phototake NYC; **p. 4, 1.4** Micrograph by Conly L. Rieder, Division of Molecular Medicine, Wadsworth Center, Albany, New York 12201-0509; **p. 5, 1.6 (top and bottom)** Carolina Biological Supply Company/Phototake NYC; **p. 5, 1.7** Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 7, 1.10** Manuel C. Peitsch/Corbis/Bettmann; **p. 7, 1.11** Photo Researchers, Inc.; **p. 8, 1.13** Oliver Meckes & Nicole Ottawa/Photo Researchers, Inc.; **p. 9, 1.15** Luis de la Maza, Ph.D., M.D./Phototake NYC; **p. 11, 1.16** Photo courtesy of Roslin Institute; **p. 11, 1.17** Science Museum/Science & Society Picture Library; **p. 12, 1.19** Alfred Pasieka/SPL/Photo Researchers, Inc.; **p. 13, 1.20(a)** John Paul Endress/Pearson Learning Photo Studio; **p. 13, 1.20(b)** Gilbert S. Grant/Photo Researchers, Inc.; **p. 13, 1.20(c)** Dr. David M. Phillips/Visuals Unlimited; **p. 14, 1.21(a)** Dr. Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc.; **p. 14, 1.21(b)** © Dr. David Phillips/Visuals Unlimited; **p. 14, 1.21(c)** From Genes & Development (1992) volume 6, pp. 1052-1057 as figure 1A. Matthew L. Springer/Cold Spring Harbor Press; **p. 14, 1.22(a)** Sinclair Stammers/Photo Researchers, Inc.; **p. 14, 1.22(b)** Wally Eberhart/Visuals Unlimited; **p. 14, 1.22(c)** © Mark Smith/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 2: Mitosis y Meiosis

p. 19, CO2 Dr. Andrew S. Bajer, University of Oregon; **p. 22, 2.2** CNRI/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 24, 2.4(a)** Cytographics/Visuals Unlimited; **p. 24, 2.4(b)** L. Lisco/Don W. Fawcett/Visuals Unlimited; **p. 28, 2.7(a-d)** Dr. Andrew S. Bajer, University of Oregon; **p. 29, 2.7(e-g)** Dr. Andrew S. Bajer, University of Oregon; **p. 37, 2.13(a)** Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.; **p. 37, 2.13(b)** Andrew Syred/SPL/Photo Researchers, Inc.; **p. 37, 2.13(c)** Biophoto Associates/Science Source/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 3: Genética mendeliana

p. 43, CO3 Archiv/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 4: Ampliaciones de la genética mendeliana

p. 73, CO4.1 a, c Dr. Ralph Somes; **p. 73, CO4.1 b, d** J. James Bitgood/University of Wisconsin, Animal Sciences Dept.; **p. 76, 4.1(a)** John D. Cunningham/Visuals Unlimited; **p. 81, 4.4(a)** Photo courtesy of Stanton K. Short (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME); **p. 81, 4.4(b)** Fred Habegger/Grant Heilman Photography, Inc.; **p. 88, 4.9** Irene Vandermolen/Animals Animals/Earth Scenes; **p. 90, 4.11(R, L)** Carolina Biological Supply Company/Phototake NYC; **p. 92, 4.13** Mary Teresa Giancoli; **p. 93, 4.14** Hans Reinhard/Bruce Coleman Inc.; **p. 95, 4.15** Debra P. Hershkowitz/Bruce Coleman Inc.; **p. 96, 4.16(B)** Tanya Wolff, Washington University School of Medicine; **p. 96, 4.16(M)** Joel C. Eissenberg, Ph.D., Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, St. Louis University Medical Center; **p. 96, 4.16(T)** Tanya Wolff, Washington University School of Medicine; **p. 96, 4.17(a)** Tanya Wolff, Washington University School of Medicine; **p. 96, 4.17(b)** Dr. Steven Henikoff, Howard Hughes Medical Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington; **p. 97, 4.18(a)** Jane Burton/Bruce Coleman Inc.; **p. 97, 4.18(b)** Dr. William S. Klug; **p. 105, Problem 14, top left** Dusty L. Perrin; **p. 105, top right,** Corbis/Bettmann; **p. 105, bottom,** John Daniels/Ardea London Limited; **p. 108, Problem 39** Dale C. Spartas/DCS Photo, Inc.; **p. 108, Problem 41, top** Nigel J.H. Smith/Animals Animals/Earth

Scenes; **p. 109, bottom** Francois Gohier/Photo Researchers, Inc.; **p. 109, Problem 44** Hans Reinhard/Bruce Coleman Inc.; **p. 103, 4.1 a, c (IS)** Dr. Ralph Somes; **p. 103, 4.1 b, d (IS)** J. James Bitgood/ University of Wisconsin, Animal Sciences Dept.

Capítulo 5: Cartografía cromosómica en eucariotas

p. 111, CO5 B. John Cabisco/Visuals Unlimited; **p. 120, 5.7** ©2002 Clare A. Hasenkampf/Biological Photo Service; **p. 133, 5.17** Dr. Sheldon Wolff & Judy Bodycote/Laboratory of Radiobiology and Environmental Health, University of California, San Francisco; **p. 134, 5.18(b)** Biophoto Assoc./Photo Researchers, Inc.; **p. 135, 5.19(b)** John D. Cunningham/Visuals Unlimited; **p. 135, 5.19(c)** Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 136, 5.20** James W. Richardson/ Visuals Unlimited.

Capítulo 6: Análisis genético y mapas en bacterias y bacteriófagos

p. 153, CO6 Dr. L. Caro/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 155, 6.2** Michael G. Gabridge/Visuals Unlimited; **p. 157, 6.15** Dennis Kunkel/Phototake NYC; **p. 164, 6.12** K.G. Murti/Visuals Unlimited; **p. 167, 6.14** M. Wurtz/Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 168, 6.16** Bruce Iverson/Bruce Iverson, Photomicrography.

Capítulo 7: Determinación del sexo y cromosomas sexuales

p. 187, CO7 Wellcome Trust Medical Photographic Library; **p. 189, 7.1** Biophoto Assoc./Photo Researchers, Inc.; **p. 190, 7.3** Bill Beatty/Visuals Unlimited; **p. 191, 7.4** Dr. Maria Gallegos, University of California, San Francisco; **p. 193, 7.6(a, b)** Courtesy of the Greenwood Genetic Center, Greenwood, SC; **p. 194, 7.7(a, b)** Catherine G. Palmer, Indiana University; **p. 199, 7.9(T, B)** Stuart Kenter Associates; **p. 200, 7.11(a)** W. Layer/Okapia/Photo Researchers, Inc.; **p. 200, 7.11(b)** Marc Henrie © Dorling Kindersley; **p. 210, Problem 31** Associated Press/Courtesy of Texas A & M University.

Capítulo 8: Mutaciones cromosómicas: variación en el número y ordenación de los cromosomas

p. 213, CO8 National Institutes of Health/Evelin Schrock, Stan du Manoir and Tom Reid, NIH; **p. 216, 8.2** Ray Clarke; **p. 217, 8.3(b)** Richard Shiell/Animals Animals/Earth Scenes; **p. 218, 8.5(a)** Courtesy of the Greenwood Genetic Center, Greenwood, SC; **p. 218, 8.5(b)** William McCoy/Rainbow; **p. 220, 8.7** David D. Weaver, M.D., Indiana University; **p. 220, 8.8** David D. Weaver, M.D., Indiana University; **p. 224, 8.12** Ken Wagner/Phototake NYC; **p. 225, 8.13(b)** Pfizer, Inc./Phototake NYC; **p. 230, 8.18(a-c)** Mary Lilly/Carnegie Institution of Washington; **p. 236, 8.26** Science VU/Visuals Unlimited.

Capítulo 9: Herencia extranuclear

p. 245, CO9 Tania Midgley/Corbis/Bettmann; **p. 247, 9.1** Grant Heilman Photography, Inc.; **p. 247, 9.2** RMF/Visuals Unlimited; **p. 248, 9.3** John D. Cunningham/Visuals Unlimited; **p. 248, 9.4(a, b)** Dr. Ronald A. Butow, Department of Molecular Biology and Oncology, University of Texas Southwestern Medical Center; **p. 250, 9.6** Dr. Richard D. Kolodnar/Dana-Farber Cancer Institute; **p. 250, 9.7** Don W. Fawcett/Kahri/Dawid/Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 254, 9.9(a, b)** Dr. Alan Pestronk, Dept. of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis; **p. 255, 9.10** John D. Cunningham/Visuals Unlimited; **p. 258, 9.13** Robert & Linda Mitchell Photography.

Capítulo 10: Estructura y análisis del DNA

p. 265, CO10 Jean Claude Revy/Phototake NYC; **p. 269, 10.3(a, b)** Bruce Iverson/Bruce Iverson, Photomicrography; **p. 272, 10.5(b)** Oliver Meckes/Max-Planck-Institut-Tubingen/Photo Researchers, Inc.; **p. 276, 10.8(b)** Runk/Schoenberger/Grant Heilman Photography, Inc.; **p. 276, 10.8(c)** Biology Media/Photo Researchers, Inc.; **p. 281, 10.13** Photo by M.H.F. Wilkins. Courtesy of Biophysics Department, King's College, London, England; **p. 285, 10.17** Ken Eward/Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 292, 10.22** Ventana Medical Systems Inc.; **p. 295, 10.27** Dr. William S. Klug.

Capítulo 11: Replicación y recombinación del DNA

p. 303, CO11 Dr. Gopal Murti/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 307, 11.5(a)** Walter H. Hodge/Peter Arnold, Inc.; **p. 307, 11.5(b, c)** Figure from «Molecular Genetics», Pt. 1 pp. 74-75, J.H. Taylor (ed). Copyright ©1963 and renewed 1991, reproduced with permission from Elsevier Science Ltd.; **p. 308, 11.6** Reprinted from CELL, Vol. 25, 1981, pp 659, Sundin and Varshavsky, (1 figure), with permission from Elsevier Science. Courtesy of A. Varshavsky; **p. 316, 11.14** Reproduced by permission from H.J. Kreigstein and D.S. Hogness, Proceedings of the National Academy of Sciences 71:136 (1974), p. 137, Fig. 2; **p. 317, 11.15** Dr. Harold Weintraub, Howard Hughes Medical Institute, Fred Hutchinson Cancer Center/«Essential Molecular Biology» 2e, Freifelder & Malachinski, Jones & Bartlett, Fig. 7-24, pp. 141.

Capítulo 12: La organización del DNA en cromosomas

p. 329, CO12 Science VU/BMRL/Visuals Unlimited; **p. 330, 12.1(a)** Dr. M. Wurtz/Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 331, 12.2** Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 332, 12.3** Dr. Gopal Murti/Science Photo Library/ Photo Researchers, Inc.; **p. 334, 12.5** Image courtesy of Brian Harmon and John Sedat, University of California, San Francisco; **p. 334, 12.6** Science Source/Photo Researchers, Inc.; **p. 335, 12.7(b)** Omikron/ Photo Researchers, Inc.; **p. 341, 12.11** Dr. David Adler/University of Washington Department of Pathology; **p. 341, 12.12** Douglas Chapman/University of Washington Department of Pathology.

Capítulo 13: El código genético y la transcripción

p. 351, CO13 Prof. Oscar L. Miller/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 371, 13.11** Bert W. O'Malley, M.D., Baylor College of Medicine; **p. 375, 13.15(b)** O.L. Miller, Jr. B.R. Beatty, Journal of Cellular Physiology, Vol. 74 (1969). Reprinted by permission of Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.

Capítulo 14: Traducción y proteínas

p. 391, 14.9(a) «The Structure and Function of Polyribosomes». Alexander Rich, Jonathan R. Warner and Howard M. Goodman, 1963. Reproduced by permission of the Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 (1963) fig. 4C (top), p. 273 ©1964; **p. 391, 14.9(b)** E.V. Kiseleva; **p. 398, 14.13(a)** Dennis Kunkel/Phototake NYC; **p. 398, 14.13(b)** Francis Leroy/Biocosmos/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 403, 14.19** Kenneth Eward/BioGrafx/Science Source/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 15: Mutación génica, reparación del DNA y transposición

p. 415, CO15 Francis Leroy/Biocosmos/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 433, 15.11** Sue Ford/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 433, 15.12(a)** Mary Evans Picture Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 438, 15.18(a, b)** W. Clark Lambert, M.D., Ph. D./

University of Medicine & Dentistry of New Jersey; **p. 441, 15.20** Stanley Cohen/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 442, 15.21(a)** Courtesy of the Barbara McClintock Papers, American Philosophical Society; **p. 442, 15.21(b)** MaizeGDB/Courtesy M.G. Neuffer.

Capítulo 16: Regulación de la expresión génica en procariotas

p. 451, CO16 Nature vol 401 Sept 16, 1999 (Cover). Article: «Structure of the trp RNA-binding attenuation protein, TRAP, bound to RNA» by Alfred A. Antson, Eleanor J. Dodson, Guy Dodson, Richard B. Greaves, Xiao-ping Chen & Paul Gollnick; **p. 461, 16.11(a-c)** Johnson Research Foundation/Science Lewis, et al/Johnson Research Foundation.

Capítulo 17: Regulación de la expresión génica en eucariotas

p. 475, 17.2(b) From: Qumsiyeh, Mazin B. 1999 «Structure and function of the nucleus: anatomy and physiology of chromatin» Cellular Molecular Life Science Vol. 55, pp. 1129-1140, Fig. 1C, pg. 1132; **p. 482, 17.12** Dr. Paul B. Sigler; **p. 489, 17.23** From Black, D.L. 2000. Protein diversity from alternative splicing: A challenge for bioinformatics and post-genome biology. Cell **103**: 367-370, Figure 1, p.368; **p. 490, 17.24** From Hannon, G.J. 2002. RNA Interference. Nature 418: 244-251, Figure 2, p.246; **p. 491, 17.25** From Matzke, M. et all. 2004. Genetic analysis of RNA mediated transcriptional gene silencing. Biochim. Biophys. Acta 1677: 127-141, Figure 1, p.1678.

Capítulo 18: Regulación del ciclo celular y cáncer

p. 501, CO18 SPL/Photo Researchers, Inc.; **p. 503, 18.1(a)** Courtesy of Hesed M. Padilla-Nash, Antonio Fargiano, and Thomas Ried. Affiliation is Section of Cancer Genomics, Genetics Branch, Center for Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; **p. 503, 18.1(b)** Courtesy of Hesed M. Padilla-Nash and Thomas Ried. Affiliation is Section of Cancer Genomics, Genetics Branch, Center for Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; **p. 504, 18.3(e-g)** SPL/Photo Researchers, Inc.; **p. 505, 18-4(a, b)** Courtesy of Professor Manfred Schwab, DKFZ, Heidelberg, Germany; **p. 510, 18.10(a)** Dr. Gopal Murti/Photo Researchers, Inc.; **p. 514, 18.13** Sung-Hou Kim, University of California, Department of Chemistry and Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California; **p. 514, 18.14** Reproduced with permission from Y. Cho, Gorina, Jeffrey and Pavletich, Science 265: pp. 346-355, fig. 6b, pg. 352. Copyright 1994. American Association for the Advancement of Science; **p. 516, 18.17** Du Cane Medical Imaging Ltd./Photo Researchers, Inc.; **p. 517, 18.18** Dr. David M. Martin/Photo Researchers, Inc.; **p. 520, 18.21** VLA/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 19: Tecnología del DNA recombinante

p. 529, CO19 Michael Gabridge/Visuals Unlimited; **p. 531, 19.1** Riken Biomolecules Gallery/Kyushu Institute of Technology; **p. 534, 19.5** K.G. Murti/Visuals Unlimited; **p. 534, 19.7** Michael Gabridge/Visuals Unlimited; **p. 535, 19.8** Dr. M. Wurtz/Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 537, 19.12** Reprinted with permission from Dr. Michael Blaber Florida State University; **p. 540, 19.16** Jon Gordon/Phototake NYC; **p. 544, 19.19** Bio-Rad Laboratories Diagnostics Group; **p. 548, 19.22** National Institutes of Health/Custom Medical Stock Photo, Inc.; **p. 552, 19.25** Reprinted with permission from Journal of Food Protection, Vol. 59, No. 6, 1996, Pages 573. Copyright held by the International Association for Food Protection, Des Moines, Iowa, U.S.A. Courtesy of Dr. Pina M. Fratamico; **p. 553, 19.27** Dr. Suzanne McCutcheon.

Capítulo 20: Genómica y proteómica

p. 563, CO20 Dr. Jeremy Burgess/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 574, 20.7** B. Boonyartanakornkit/D. S. Clark, Vrdoljak/Visuals Unlimited; **p. 577, 20.11** Holt Studios International/Photo Researchers, Inc.; **p. 583, 20.18** The Institute for Genomic Research; **p. 584, 20.19** Reprinted from Genomics Vol 61, N.2, Breen, M. et.al., Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotypes of the domestic dog (conis familiaris) and human, pp145-155, © 1999, with permission from Elsevier; **p. 584, 20.20** From Maglich J.M., Sluder A.E., et al., Beyond the human genome: examples of nuclear receptor analysis in model organisms and potential for drug discovery, American Journal of PharmacoGenomics, 2003; Volume 3, Issue 5: 345-353. Figure 1 on page 345; **p. 592, 20.27** Dr. Carl Merril/Laboratory of Biochemical Genetics of the National Institute of Mental Health, NIH; **p. 592, 20.28** Geoff Tompkinson/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 593, 20.29(a)** ©BioPhoto/Photo Researchers, Inc.; **p. 508, 20.29(b)** Dr. David Pulak/Cellnucleus.com; **p. 594, 20.30** From: Aebersold, R. and Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. Reprinted with permission from Nature 422: 198-207, Fig. 4, pg 203. Copyright Macmillan Magazines Limited.

Capítulo 21: Disección de la función génica: análisis mutacional en organismos modelo

p. 603, CO21 Jean Claude Revy - ISM/Phototake NYC; **p. 606, 21.2(a)** Dr. Stanley Flegler/Visuals Unlimited; **p. 606, 21.2(b)** A.B. Dowsett/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.; **p. 607, 21.3(a)** The Provincial Museum of Alberta; **p. 607, 21.3(b)** Dr. Kimberly A. Hughes and Dr. Kevin A. Dixon/Department of Animal Biology/University of Illinois at Urbana-Champaign; **p. 610, 21.6(a)** Hank Morgan; **p. 610, 21.6(b)** Dr. R.L. Brinster/Peter Arnold, Inc.; **p. 623, 21.14(a-c)** Dr. Mario Capecchi - Figure 3a in: Hostikka SL, Capecchi MR, «The mouse Hoxc11 gene: genomic structure and expression pattern». Mech Dev. 1998 Jan;70(1-2):133-45; **p. 623, 21.15** Reproduced by permission of the American Society for Cell Biology from Molecular & Cellular Biology (20:8536-47). Copyright by the American Society for Cell Biology. Image courtesy of Dr. Gideon Dreyfuss; **p. 623, 21.16(a1, a2, b1, b2)** Reproduced with permission from Figure 2 from: Hjalt TA, Semina EV, Amendt BA, Murray JC (2000) The Pitx2 protein in mouse development. Developmental Dynamics 218:195-200). Copyright © John Wiley & Sons, Inc.; **p. 631, 21.22(a)** Dr. Lee Hartwell/Fred Hutchinson Cancer Research Center; **p. 631, 21.22(b)** Gabi Seethaler/Dr. Tim Hunt/Cancer Research UK; **p. 631, 21.22(c)** Dr. Paul Nurse; **p. 631, 21.23(a)** Figure 1 from Hartwell, L. et al. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science 183:46-51. Copyright American Association for the Advancement of Science; **p. 632, 21.24(a)** Adapted from Figure 3 from «Hartwell, L. et al. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science 183:46-51». Copyright American Association for the Advancement of Science; **p. 632, 21.24(b)** Figure 5 from «Hartwell, L. et al. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science 183:46-51». Copyright American Association for the Advancement of Science; **p. 633, 21.25** Christiane Nusslein-Volhard, Max Planck Institute of Developmental Biology, Tubingen, Germany; **p. 635, 21.27** Christiane Nusslein-Volhard, Max Planck Institute of Developmental Biology, Tubingen, Germany; **p. 636, 21.28(a)**

Corbis/Bettmann; **p. 636, 21.28(b)** The Scotsman/Corbis/Sygma; **p. 637, 21.29** Courtesy of Tim Miller and Don Cleveland, University of California, San Diego.

Capítulo 22: Aplicaciones y ética de la biotecnología

p. 643, CO22 Affymetrix, Inc.; **p. 646, 22.3** Reprinted with permission from «New Genes Boost Rice Nutrients» by I. Potrykus and P. Beyer, Science, August 13, 1999, Vol. 285, pp. 994; **p. 648, 22.5** Hank Morgan/Photo Researchers, Inc.; **p. 649, 22.6** Charles J. Arntzen, Florence Ely Nelson Distinguished Professor and Founding Director, Arizona Biomedical Institute at Arizona State University; **p. 645, 22.2** Reprinted with permission from International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Inc c/o IRRI los Banos, Laguna, Philippines; **p. 650, 22.7** Reprinted with permission from Biodesign Institute Arizona State university Box 5001 Tempe AZ 85281-5001; **p. 654, 22.13(a)** Cancer Genetics Branch/National Human Genome Research Institute/NIH; **p. 655, 22.15** Reprinted with permission from Ash Alizadeh, Nature Magazine 2000: 403, pgs. 503-511, figure 4 left panel. Copyright 2000 Macmillian Magazines Limited; **p. 656, 22.17** GeneChip(R) Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Courtesy of Affymetrix, Inc.; **p. 657, 22.19** Van De Silva; **p. 664, 22.26(a)** Dorothy Warburton/Phototake NYC; **p. 664, 22.26(b)** Courtesy of Werner Schempp; Glaser, Yer and Schempp et al (1998), with kind permission of Kluwer Academic Publishers. From Chromosome Research 6:481-486 (1998), Figure 4, published by Kluwer Academic Publishers: www.kluweronline.nl; **p. 666, 22.28** Courtesy of Cellmark.

Capítulo 23: Genética del desarrollo de organismos modelo

p. 675, CO23 Edward B. Lewis, California Institute of Technology; **p. 676, 23.1(a)** F.R. Turner/Visuals Unlimited; **p. 676, 23.1(b)** R. Calentine/Visuals Unlimited; **p. 678, 23.2(a)** Darwin Dale/Photo Researchers, Inc.; **p. 678, 23.2(b)** Tanya Wolff, Washington University School of Medicine; **p. 679, 23.3(a)** Urs Kloter/Georg Halder, University of Basel, Switzerland; **p. 680, 23.5** Dr. William S. Klug, The College of New Jersey; **p. 682, 23.7(a)** F. Rudolf Turner, Indiana University; **p. 685, 23.11** Jim Langeland, Stephen Paddock, and Sean Carroll, University of Wisconsin at Madison; **p. 685, 23.13(a)** Peter A. Lawrence and P. Johnston, «Development», 105, 761-767 (1989); **p. 685, 23.13(b)** Peter A. Lawrence «The Making of a Fly», Blackwells Scientific, 1992; **p. 686, 23.14** Jim Langeland, Stephen Paddock, and Sean Carroll, University of Wisconsin at Madison; **p. 686, 23.15(a, b)** Reproduced by permission from T. Kaufmann, et al., Advanced Genetics 27:309-362, 1990. Image courtesy of F. Rudolf Turner, Indiana University; **p. 688, 23.18** Courtesy of Dr. Alexey Veraksa and Dr. William McGinnis; **p. 688, 23.19** Reproduced with permission from [Figure 1a on page 332 from «Kmita, M. and Duboule, D. 2003. Organizing Axes in Time and Space; 25 Years of Colinear Tinkering. Science 2003 301;331-333».]. Copyright American Association for the Advancement of Science; **p. 689, 23.20** P. Barber/Custom Medical Stock Photo, Inc.; **p. 691, 23.23** Elliot M. Meyerowitz, California Institute of Technolgy, Division of Biology; **p. 691, 23.24(a, b)** Max-Planck-Institut fur Entwicklungsbiologie; **p. 692, 23.26(a-d)** Dr. Jose Luis Riechmann, Division of Biology, California Institute of Technolgy. From Science 2002: 295, pp. 1482-85; **p. 694, 23.28** James King-Holmes/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 24: Genética cuantitativa y caracteres multifactoriales

p. 703, CO24 Ed Reschke/Peter Arnold, Inc.; **p. 716, 24.8** Courtesy of Dr. Steven D. Tanksley, Cornell University.

Capítulo 25: Genética de poblaciones

p. 725, CO25 Edward S. Ross, California Academy of Sciences; **p. 730, 25.4** From Leibert, F.et al., 1998. The CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasion populations has a single and recent origin in northeastern Europe. Human Molecular Genetics 7: 399-406, by permission of Oxford University Press; **p. 729, 25.3** Michel Samson, Frederick Libert, et al., «Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene». Reprinted with permission from Nature [vol. 382, 22 August 1996, p. 725, Fig. 3]. Copyright 1996 Macmillan Magazines Limited; **p. 736, 25.9** Larsh K. Bristol/Visuals Unlimited; **p. 737, 25.10** Hans Pfletschinger/Peter Arnold, Inc.

Capítulo 26: Genética evolutiva

p. 751, CO26 Breck P. Kent/Animals Animals/Earth Scenes; **p. 755, 26.3** Reprinted from Trends in Genetics 8: 392-98 Tsui L., The spectrum of cystic fibrosis mutations, copyright 1992, with permission from Elsevier; **p. 758, 26.8** From Powers, D.A. and Schulte, P.M. 1998. Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment, J. Exp. Zool. Reprinted by permission of Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc; and reprinted with permission from the Annual Review of Genetics, Volume 25 © 2001 by Annual Reviews *www.annualreviews.org*; **p. 761, 26.9** Carl C. Hansen/Nancy Knowlton/Smithsonian Institution Photo Services; **p. 762, 26.11(a, b)** Kenneth Y. Kaneshiro, Ph.D., Director/University of Hawaii/CCRT; **p. 763, 26.13(a, b)** Courtesy of Toby Bradshaw and Doug W. Schemske, University of Washington. Photo by Jordan Rehm; **p. 764, 26.15(a, b)** Dr. Paul V. Loiselle; **p. 765, 26.16** Fig. 5 in Molecular Biology Evolution 15 (4) pages 391-407, Kazuhiko Takahasi/Norihiro Okada. The Society for Molecular Biology and Evolution; **p. 765, 26.17** C.B. & D.W. Frith/Bruce Coleman Inc.; **p. 767, 26.19** From Sibley, C.G. and Ahlquist, J.E. 1987. DNA hybridization evidence of hominoid phylogeny: results from an expanded data set. J.Mol.Evol. 26:99-121.Table 1, p101. with permission from Springer-Verlag GmbH; **p. 769, 26.20** From Fitch, W.M. et al., 1991. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. Proc Natl. Acad.Sci. USA 88: 4270-73; **p. 770, 26.21** Reprinted from Current Biology Vol 7, No.3, Hillis, Phylogenic Analysis, pp R129-R131, Figure 1, copyright 1998 with permission from Elsevier.

Capítulo 27: Genética de la conservación

p. 777, CO27 Scott Bauer/USDA/ARS/Agricultural Research Service; **p. 779, 27.2(a)** David Austen; **p. 779, 27.2(b)** Sarah Ward/Department of Soil and Crop Services/Colorado State University; **p. 780, 27.3** Sarah Ward/Department of Soil and Crop Services/Colorado State University; **p. 782, 27.4** Johnny Johnson/DRK Photo; **p. 784, 27.6** Art Wolfe/Getty Images Inc. - Stone Allstock; **p. 784, 27.7** Tim Thompson/Corbis/Bettmann; **p. 787, 27.10** Jim Brandenburg/Minden Pictures; **p. 789, 27.11** Lynn Stone/Animals Animals/Earth Scenes.

Índice

Nota: En **negrita** se indica la presencia del término en una figura. En *itálica* se indica la presencia del término en una tabla.

A

B

D

E

F

G

H

O

P

Q

R

S

U

V

W

X

Y

Z



La publicación de la octava edición de *Conceptos de Genética* tiene como objetivo familiarizar a los estudiantes con los descubrimientos más importantes de los pasados 150 años y ayudarles a relacionar esta información con los mecanismos genéticos subyacentes que explican los procesos celulares, la diversidad biológica y la evolución. Además, también se han puesto de relieve las conexiones entre la genética de la transmisión, la genética molecular, la genómica y la proteómica.

Con una organización más clara y una pedagogía más estimulante, en cada capítulo se facilita la comprensión de conceptos y se desarrolla una visión analítica de la resolución de problemas biológicos.

Para ayudar al alumno, se han revisado los capítulos, se han incluido algunos nuevos, se han modernizado los temas, las ilustraciones y las fotografías se han actualizado y se ha puesto especial énfasis en la introducción de nuevos ensayos sobre cada materia.

Incluye:



LibroSite es una página web asociada al libro, con una gran variedad de recursos y material adicional tanto para los profesores como para los estudiantes. Apoyos a la docencia, ejercicios de autocontrol, enlaces relacionados, material de investigación, etc., hacen de LibroSite el complemento académico perfecto para este libro.



www.pearsoneducacion.com



ISBN 13: 978-84-2055-014-5